Dokument ten służy wyłącznie do celów informacyjnych i nie ma mocy prawnej. Unijne instytucje nie ponoszą żadnej odpowiedzialności za jego treść. Autentyczne wersje odpowiednich aktów prawnych, włącznie z ich preambułami, zostały opublikowane w Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej i są dostępne na stronie EUR-Lex. Bezpośredni dostęp do tekstów urzędowych można uzyskać za pośrednictwem linków zawartych w dokumencie

►B

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 440/2008

z dnia 30 maja 2008 r.

ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH)

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

(Dz.U. L 142 z 31.5.2008, s. 1)

zmienione przez:

		Dziennik Urzędowy		
		nr	strona	data
►M1	Rozporządzenie Komisji (WE) nr 761/2009 z dnia 23 lipca 2009 r.	L 220	1	24.8.2009
►M2	Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1152/2010 z dnia 8 grudnia 2010 r.	L 324	13	9.12.2010
►M3	Rozporządzenie Komisji (UE) nr 640/2012 z dnia 6 lipca 2012 r.	L 193	1	20.7.2012
►M4	Rozporządzenie Komisji (UE) nr 260/2014 z dnia 24 stycznia 2014 r.	L 81	1	19.3.2014
►M5	Rozporządzenie Komisji (UE) nr 900/2014 z dnia 15 lipca 2014 r.	L 247	1	21.8.2014
►M6	Rozporządzenie Komisji (UE) 2016/266 z dnia 7 grudnia 2015 r.	L 54	1	1.3.2016
►M7	Rozporządzenie Komisji (UE) 2017/735 z dnia 14 lutego 2017 r.	L 112	1	28.4.2017
►M8	Rozporządzenie Komisji (UE) 2019/1390 z dnia 31 lipca 2019 r.	L 247	1	26.9.2019

▼B

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 440/2008

z dnia 30 maja 2008 r.

ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH)

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

Artykuł 1

Metody badań stosowanych do celów rozporządzenia 1907/2006/WE określa się w załączniku do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

W stosownych przypadkach Komisja dokona przeglądu metod badań określonych w niniejszym rozporządzeniu pod kątem możliwości zastępowania, ograniczania i doskonalenia badań na zwierzętach kręgowych.

Artykuł 3

Wszelkie odesłania do załącznika V do dyrektywy 67/548/EWG są traktowane jako odesłania do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 4

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie następnego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie stosuje się od dnia 1 czerwca 2008 r.

▼B

ZAŁĄCZNIK

▼M6

Uwaga:

Przed zastosowaniem którejkolwiek z poniższych metod badawczych w celu zbadania substancji wieloskładnikowej, substancji o nieznanym lub zmiennym składzie, złożonego produktu reakcji lub materiału biologicznego (UVCB), lub mieszaniny oraz w przypadkach, gdy zastosowanie metody badawczej do badania substancji wieloskładnikowej, UVCB lub mieszanin nie zostało określone w danej metodzie badawczej, należy rozważyć, czy dana metoda jest adekwatna do zamierzonego celu regulacyjnego.

Jeżeli daną metodę badawczą stosuje się do badania substancji wieloskładnikowej, UVCB lub mieszaniny, należy w miarę możliwości udostępnić wystarczające informacje na temat jej składu, np. nazwę chemiczną jej składników, ich ilości oraz istotne właściwości jej składników.

▼B

CZĘŚĆ A: METODY USTALANIA WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNYCH

SPIS TREŚCI

A.1. TEMPERATURA TOPNIENIA/KRZEPNIĘCIA

A.2. TEMPERATURA WRZENIA

A.3. GĘSTOŚĆ WZGLĘDNA

A.4. CIŚNIENIE PARY

A.5. NAPIĘCIE POWIERZCHNIOWE

A.6. ROZPUSZCZALNOŚĆ W WODZIE

A.8. WSPÓŁCZYNNIK PODZIAŁU

A.9. TEMPERATURA ZAPŁONU

A.10. ZAPALNOŚĆ (CIAŁA STAŁE)

A.11. ZAPALNOŚĆ (GAZY)

A.12. ZAPALNOŚĆ (W KONTAKCIE Z WODĄ)

A.13. WŁAŚCIWOŚCI PIROFORYCZNE CIAŁ STAŁYCH I CIECZY

A.14. WŁAŚCIWOŚCI WYBUCHOWE

A.15. TEMPERATURA SAMOZAPŁONU (CIECZE I GAZY)

A.16. WZGLĘDNA TEMPERATURA SAMOZAPŁONU DLA CIAŁ STAŁYCH

A.17. WŁAŚCIWOŚCI UTLENIAJĄCE (CIAŁA STAŁE)

A.18. ŚREDNIA LICZBOWA MASA CZĄSTECZKOWA I ROZKŁAD MASY CZĄSTECZKOWEJ POLIMERÓW

A.19. ZAWARTOŚĆ POLIMERÓW O MAŁEJ MASIE CZĄSTECZKOWEJ

A.20. ZACHOWANIE POLIMERÓW W WODZIE – ROZPUSZCZANIE/EKSTRAKCJA

A.21. WŁAŚCIWOŚCI UTLENIAJĄCE (CIECZE)

A.22. WAŻONA DŁUGOŚCIĄ ŚREDNIA GEOMETRYCZNA ŚREDNICA WŁÓKIEN

A.23. WSPÓŁCZYNNIK PODZIAŁU (1-OKTANOL/WODA): METODA POWOLNEGO MIESZANIA

A.24. WSPÓŁCZYNNIK PODZIAŁU (N-OKTANOL/WODA), METODA WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC)

A.25. STAŁE DYSOCJACJI W WODZIE (METODA MIARECZKOWA – METODA SPEKTROFOTOMETRYCZNA – METODA KONDUKTOMETRYCZNA)

▼B

A.1. **TEMPERATURA TOPNIENIA/KRZEPNIĘCIA**

1. **METODA**

Większość opisanych metod oparto na wytycznych OECD dotyczących badań (1). Podstawowe zasady podano w pozycjach bibliograficznych (2) i (3).

1.1. WPROWADZENIE

Opisane metody i urządzenia powinny być stosowane do ustalania temperatury topnienia substancji, bez ograniczeń związanych z ich stopniem czystości.

Wybór metody zależy od charakteru badanej substancji. W konsekwencji, czynnikiem ograniczającym będzie to, czy substancja łatwo, z trudnością czy też wcale nie poddaje się sproszkowaniu.

W przypadku niektórych substancji bardziej właściwe jest oznaczanie temperatury zamarzania lub krzepnięcia, przy czym w wytycznych uwzględniono także normy dla tych oznaczeń.

Jeżeli z powodu szczególnych właściwości substancji żaden z powyższych parametrów nie może być zmierzony w sposób konwencjonalny, może być stosowne określenie temperatury płynięcia.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Temperaturę topnienia definiuje się jako temperaturę, w której przejście fazowe ze stanu stałego do stanu ciekłego zachodzi pod ciśnieniem atmosferycznym i niniejsza temperatura idealnie odpowiada temperaturze krzepnięcia.

Ponieważ przechodzenie z jednego stanu skupienia do drugiego w przypadku wielu substancji zachodzi w szerokim zakresie temperatury, często opisuje się go jako zakres temperatury topnienia.

Jednostki konwersji (ze stopni K na ^{o}C)

$t = T - 273{,}15$

t: temperatura Celsjusza, stopień Celsjusza (^{o}C)

T: temperatura termodynamiczna, stopień Kelwina (K)

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

Niektóre substancje kalibracyjne wymieniono w pozycji bibliograficznej (4).

▼B

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Temperatura (zakres temperatur) przejścia fazowego ze stanu stałego do stanu ciekłego lub ze stanu ciekłego w stan stały jest ustalona. W praktyce podczas podgrzewania/schładzania próbki substancji badanej pod ciśnieniem atmosferycznym ustalane są temperatury etapu początkowego topnienia/krzepnięcia i końcowego etapu topnienia/krzepnięcia. Opisano pięć rodzajów metod, mianowicie metodę kapilarną, metody ze stolikami grzewczymi, ustalanie temperatur krzepnięcia, metody analiz termicznych, i ustalanie temperatury płynięcia (według rozwiniętych opracowań dla olejów naftowych).

W niektórych przypadkach wygodniejsze jest zmierzenie temperatury krzepnięcia w miejsce temperatury topnienia.

1.4.1. **Metoda kapilarna**

1.4.1.1. *Przyrządy do oznaczania temperatury topnienia z łaźnią cieczową*

Niewielką ilość drobno zmielonej substancji umieszcza się w rurce kapilarnej i ciasno upakowuje. Rurkę podgrzewa się łącznie z termometrem, regulując wzrost temperatury w ten sposób, aby wynosił mniej niż 1 K/min w trakcie topnienia. Oznacza się początkową i końcową temperaturę topnienia.

1.4.1.2. *Przyrządy do oznaczania temperatury topnienia z blokiem metalu*

Zgodnie z opisem w ppkt 1.4.1.1, z tym że rurka kapilarna i termometr są umieszczone w podgrzewanym bloku metalu, przy czym można je obserwować przez znajdujące się w nim otwory.

1.4.1.3. *Wykrywanie przy pomocy komórki fotoelektrycznej*

Próbka w rurce kapilarnej jest automatycznie podgrzewana w cylindrze metalowym. Wiązka światła jest automatycznie kierowana przez substancję, poprzez dziurę w cylindrze, do precyzyjnie skalibrowanej komórki fotoelektrycznej. Właściwości optyczne większości substancji zmieniają się z nieprzezroczystych na przezroczyste podczas topnienia. Natężenie światła docierającego do komórki fotoelektrycznej zwiększa się, w wyniku czego wysyłany jest sygnał zatrzymania do cyfrowego wskaźnika odczytującego temperaturę z platynowego termometru oporowego umieszczonego w komorze grzejnej. Metoda ta nie ma zastosowania do niektórych intensywnie zabarwionych substancji.

1.4.2. **Płyty grzewcze**

1.4.2.1. *Płyta grzewcza Koflera*

W metodzie płyty grzewczej Koflera wykorzystuje się dwa kawałki metalu o różnym przewodnictwie cieplnym, podgrzewane elektrycznie, przy czym stolik jest zaprojektowany w taki sposób, aby gradient temperatury był prawie liniowy wzdłuż jego długości. Temperatura rozgrzanej płyty może dochodzić od 283 do 573 K, przy czym odczytywana jest ona przy pomocy specjalnego urządzenia do odczytywania temperatury, składającego się z suwaka ze wskaźnikiem i klapki przeznaczonej dla odpowiedniego stolika. W celu ustalenia temperatury topnienia, substancję umieszcza się cienką warstwą bezpośrednio na powierzchni gorącej płyty. W ciągu kilku sekund pokazuje się ostra linia oddzielająca ciecz od fazy stałej. Temperaturę na wysokości linii dzielącej odczytuje się przez ustawienie wskaźnika w taki sposób, aby spoczywał na tej linii.

▼B

1.4.2.2. *Mikroskop do badania topnienia*

Szereg mikroskopowych płyt grzewczych wykorzystuje się do ustalania temperatury przy użyciu bardzo małych ilości materiału. W większości płyt grzewczych temperaturę mierzy się przy pomocy czułego termoogniwa, jednak czasem wykorzystywane są także termometry rtęciowe. Typowy przyrząd mikroskopowy do oznaczania temperatury topnienia metodą podgrzewania płyty jest wyposażony w komorę grzewczą, która zawiera płytkę metalową, na której umieszczana jest próbka na szkiełku. W środku płytki metalowej znajduje się otwór, przez którą wchodzi światło z lusterka oświetlającego mikroskopu. W trakcie użycia, komora jest zamknięta przez szklaną płytę w celu odcięcia powietrza od obszaru próbki.

Podgrzewanie próbki jest regulowane za pomocą reostatu. Dla bardzo precyzyjnych pomiarów dla substancji optycznie anizotropowych, stosuje się światło spolaryzowane.

1.4.2.3. *Metoda menisku*

Metodę tę wykorzystuje się głównie w odniesieniu do poliamidów.

W sposób wizualny oznacza się temperaturę, przy której zachodzi przemieszczenie menisku oleju silikonowego, zawartego między płytą grzewczą i szklaną przykrywką opartą na próbce badanego poliamidu.

1.4.3. **Metoda oznaczania temperatury krzepnięcia**

Próbkę umieszcza się w specjalnej probówce i umieszcza w przyrządzie dla oznaczania temperatury krzepnięcia. Próbka jest delikatnie i ciągle mieszana w trakcie chłodzenia, a temperatura jest mierzona w odpowiednich przedziałach. Gdy tylko temperatura pozostaje na stałym poziomie podczas kilku kolejnych odczytów (skorygowanych o błąd termometru), zapisuje się ją jako temperaturę krzepnięcia.

Należy zapobiegać szybkiemu schładzaniu przez utrzymywanie równowagi między fazą stałą i fazą ciekłą.

1.4.4. **Analiza termiczna**

1.4.4.1. *Różnicowa analiza termiczna (DTA)*

Niniejsza technika rejestruje różnicę w temperaturach między daną substancją i materiałem odniesienia w funkcji temperatury, w trakcie poddawania danej substancji i materiału odniesienia temu samemu programowi kontrolowania temperatury. W momencie gdy próbka ulega przemianie pociągającej zmianę entalpii, zmiana ta jest wskazywana przez odchylenie endotermiczne (topnienie) lub egzotermiczne (krzepnięcie) od linii bazowej zapisu temperatury.

▼B

1.4.4.2. *Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)*

Niniejsza technika rejestruje różnicę w energii pobranej przez daną substancję i materiał odniesienia, w funkcji temperatury, w trakcie poddawania danej substancji i materiału odniesienia temu samemu programowi kontrolowania temperatury. Niniejsza energia jest energią konieczną do osiągnięcia zerowej różnicy temperatury między daną substancją a materiałem odniesienia. W momencie, gdy próbka ulega przemianie pociągającej zmianę entalpii, zmiana ta jest wskazywana przez odchylenie endotermiczne (topnienie) lub egzotermiczne (krzepnięcie) od linii bazowej zapisu przepływu ciepła.

1.4.5. **Temperatura płynięcia**

Niniejsza metoda została opracowana dla olejów naftowych i jest właściwa do zastosowania dla substancji olejowych o niskich temperaturach topnienia.

Po ogrzaniu wstępnym próbka jest chłodzona z właściwą szybkością i badane są w odstępach co 3 K charakterystyki przepływu. Najniższa temperatura, przy której jest obserwowany ruch substancji, jest odczytywana jako temperatura płynięcia.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Stosowalność i dokładność różnych metod wykorzystywanych do oznaczania temperatury topnienia/zakres temperatur topnienia przedstawiono w poniższej tabeli:

TABELA: STOSOWALNOŚĆ METOD

A. **Metody kapilarne**

Metoda pomiaru	Substancje łatwo proszkowalne	Substancje trudno proszkowalne	Zakres temperatury	Założona dokładność [1]	Istniejąca norma
Przyrządy do pomiaru temperatury topnienia z łaźnią cieczową	tak	Tylko niektóre	273 do 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Przyrządy do pomiaru temperatury topnienia z blokiem metalu	tak	Tylko niektóre	293 do > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Wykrywanie przy pomocy komórki fotoelektrycznej	tak	Poszczególne z zastosowaniem urządzeń	253 do 573 K	± 0,5 K	

[1] W zależności od typu przyrządu i stopnia czystości substancji.

▼B

B. **Metody temperaturowe i schładzania**

Metoda pomiaru	Substancje łatwo proszkowalne	Substancje trudno proszkowalne	Zakres temperatury	Założona dokładność (1)	Istniejąca norma
Płyta grzewcza Koflera	tak	nie	283 do > 573 K	± 1 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Mikroskop do badania topnienia	tak	Tylko niektóre	273 do > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Metoda menisku	nie	Specyficzna dla poliamidów	293 do > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Metody badania temperatur krzepnięcia	tak	tak	223 do 573 K	± 0,5 K	e.g. BS 4695

(1) W zależności od typu przyrządu i stopnia czystości substancji.

C. **Analizy termiczne**

Metoda pomiaru	Substancje łatwo proszkowalne	Substancje trudno proszkowalne	Zakres temperatury	Założona dokładność (1)	Istniejąca norma
Różnicowa analiza termiczna	tak	tak	173 do 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Rożnicowa kalorymetria skaningowa	tak	tak	173 do 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) W zależności od typu przyrządu stopnia czystości substancji.

D. **Temperatura płynięcia**

Metoda pomiaru	Substancje łatwo proszkowalne	Substancje trudno proszkowalne	Zakres temperatury	Założona dokładność (1)	Istniejąca norma
Temperatura płynięcia	Dla olejów naftowych i substancji oleistych	Dla olejów naftowych i substancji oleistych	223 do 323 K	± 0,3 K	ASTM D 97-66

(1) W zależności od typu przyrządu i stopnia czystości substancji.

1.6. OPIS METOD

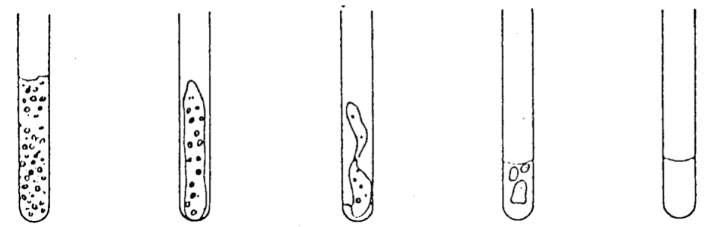
Procedury przeprowadzenia oznaczeń według prawie wszystkich metod opisano w normach międzynarodowych i krajowych (zob. dodatek 1).

1.6.1. **Metody z wykorzystaniem rurki kapilarnej**

Drobno sproszkowane substancje poddawane powolnemu wzrostowi temperatury, zwykle wykazują etapy topnienia przedstawione na rys. 1.

▼B

Rysunek 1



Etap A (Początek topnienia): drobne kropelki przylegają jednorodnie do wewnętrznej ściany rurki kapilarnej.

Etap B Pokazuje się przerwa między próbką i ścianą wewnętrzną ze względu na kurczenie się topionej substancji.

Etap C Skurczona próbka zaczyna zapadać się w dół i upłynnia się.

Etap D Na powierzchni tworzy się pełny menisk, jednak dostrzegalna ilość próbki pozostaje w stanie stałym.

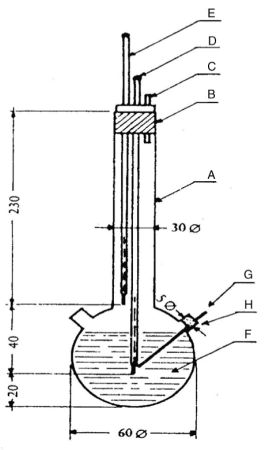
Etap E (Końcowy etap topnienia): brak cząstek stałych.

W trakcie ustalania temperatury tapnienia odnotowuje się temperatury na początku topnienia i na etapie końcowym.

1.6.1.1. *Przyrząd do badania temperatury topnienia z łaźnią cieczową*

Na rysunku 2 przedstawiono rodzaj znormalizowanego przyrządu do badania temperatury topnienia wykonanego ze szkła (JTS K 0064); wszystkie wymiary podano w milimetrach.

Rysunek 2



A: Naczynie pomiarowe
B: Korek
C: Odpowietrzenie
D: Termometr
E: Termometr pomocniczy
F: Łaźnia cieczowa
G: Rurka kapilarna szklana, długości 80 do 100 mm, średnicy wewnętrznej 1,0 ± 0,2 mm, grubość ścianki 0,2 do 0,3 mm
H: Rurka boczna

▼B

Łaźnia cieczowa:

Należy wybrać odpowiednią ciecz. Wybór cieczy zależy od temperatury topnienia, która ma być oznaczona, na przykład ciekła parafina dla temperatur topnienia nie wyższych od 473 K, olej silikonowy dla temperatur topnienia nie wyższych niż 573 K.

Dla temperatur topnienia powyżej 523 K można wykorzystać mieszaninę składającą się z trzech części kwasu siarkowego i dwóch części siarczanu potasu (wagowo). Należy podjąć stosowne środki ostrożności przy stosowaniu mieszaniny takiej jak niniejsza.

Termometr:

Należy używać wyłącznie termometrów spełniających wymagania następujących norm lub norm równoważnych:

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

Procedura:

Suchą substancję należy drobno sproszkować w moździerzu i wprowadzić do rurki kapilarnej zatopionej na końcu, tak aby poziom napełnienia wynosił około 3 mm po ciasnym upakowaniu. Aby uzyskać jednolicie upakowaną próbkę, należy spuścić rurkę kapilarną z wysokości około 700 mm przez rurkę szklaną, pionowo na szkiełko zegarkowe.

Napełnioną rurkę kapilarną umieszcza się w łaźni tak, by środkowa część rtęciowej bańki termometru stykała się z rurką kapilarną w części, w której umieszczona jest próbka. Zwykle rurkę kapilarną wprowadza się do przyrządu o temperaturze o około 10 K niższej od temperatury topnienia.

Ciecz łaźni jest podgrzewana w ten sposób, aby temperatura rosła o około 3 K/min. Ciecz należy mieszać. Przy około 10 K poniżej oczekiwanej temperatury topnienia szybkość przyrostu temperatury ustawia się na maksimum 1 K/min.

Obliczenie:

Temperaturę topnienia oblicza się na podstawie następującego wzoru:

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

gdzie:

T = skorygowana temperatura topnienia w stopniach K,

T_D = odczyt temperatury z termometru D w stopniach K,

T_E = odczyt temperatury z termometru E w stopniach K,

n = liczba kresek podziałki słupka rtęci na termometrze D przy rurce wyjściowej.

1.6.1.2. *Przyrządy do pomiaru temperatury topnienia z metalowym blokiem*

Przyrząd:

Składa się z:

— cylindrycznego bloku metalowego, którego górna część jest wydrążona i tworzy komorę (zob. rysunek 3),

— zatyczki metalowej z dwiema lub większą liczbą dziur, która pozwala na montowanie probówek na bloku metalowym,

▼B

— systemu grzejnego do podgrzewania bloku metalowego, wyposażonego na przykład w grzałki oporowe elektryczne zamknięty w bloku,

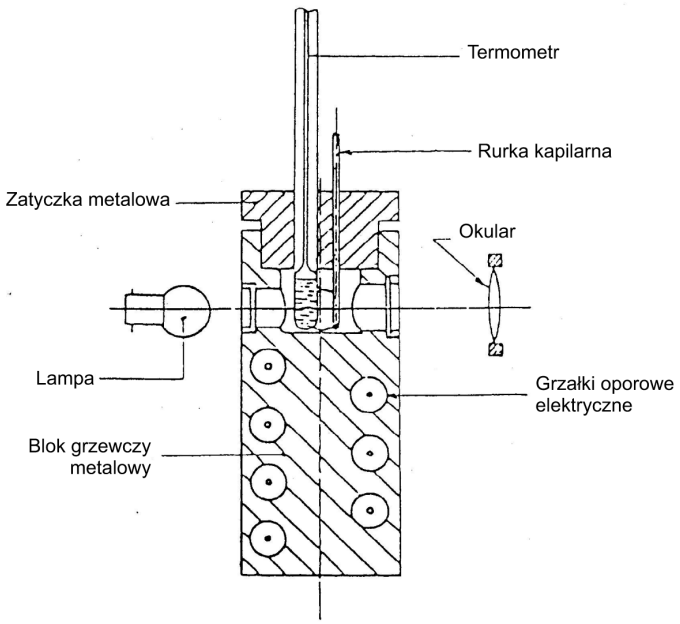
— reostatu do regulacji zasilania, jeżeli stosowane jest podgrzewanie elektryczne,

— czterech okienek ze szkła żaroodpornego na poprzecznych ścianach komory, zorientowanych pod kątem prostym względem siebie. Przed każdym z okienek zamontowany jest okular do obserwacji rurki kapilarnej. Pozostałe trzy okienka są wykorzystywane do oświetlania wnętrza zamknięcia przy pomocy lamp,

— rurki kapilarnej ze szkła żaroodpornego, zamkniętej na jednym końcu (zob. ppkt 1.6.1.1).

Zob. normy wspomniane w ppkt 1.6.1.1. Stosuje się także termoelektryczne przyrządy pomiarowe o porównywalnej dokładności.

Rysunek 3



1.6.1.3. *Wykrywanie przy pomocy komórki fotoelektrycznej*

Przyrząd i procedura:

Przyrząd składa się z komory metalowej z automatycznym systemem grzewczym. Trzy rurki kapilarne są napełniane zgodnie z ppkt 1.6.1.1 i umieszczane w piecu.

▼B

Możliwych jest kilka liniowych ustawień narastania temperatury w celu skalibrowania przyrządu, przy czym właściwy wzrost temperatury jest regulowany elektrycznie na z góry określoną stałą i szybkość liniową. Rejestratory pokazują rzeczywistą temperaturę pieca i temperaturę substancji w rurkach kapilarnych.

1.6.2. **Płyty grzewcze**

1.6.2.1. *Płyta grzewcza Koflera*

Zob. dodatek.

1.6.2.2. *Mikroskop do badania topnienia*

Zob. dodatek.

1.6.2.3. *Metoda menisku (poliamidy)*

Zob. dodatek.

Szybkość grzania w obrębie temperatury topnienia powinna być mniejsza niż 1 K/min.

1.6.3. **Metody oznaczania temperatury krzepnięcia**

Zob. dodatek.

1.6.4. **Analiza termiczna**

1.6.4.1. *Różnicowa analiza termiczna*

Zob. dodatek.

1.6.4.2. *Różnicowa kalorymetria skaningowa*

Zob. dodatek.

1.6.5. **Oznaczanie temperatury płynięcia**

Zob. dodatek.

2. **DANE**

W niektórych przypadkach konieczna jest korekcja termometru.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— zastosowana metoda,

— precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia) i wstępny etap oczyszczenia, jeśli wykonano,

— ocena dokładności.

Jako temperaturę topnienia przedstawia się średnią z co najmniej dwóch pomiarów znajdujących się w granicach oszacowanej dokładności pomiarowej (zob. tabele).

▼B

Jeżeli różnica między temperaturą na początku i na końcowym etapie topnienia znajduje się w granicach dokładności metody, za temperaturę topnienia przyjmuje się temperaturę na końcowym etapie topnienia; w innym przypadku podaje się obie temperatury.

Jeżeli substancja przed osiągnięciem temperatury topnienia rozkłada się lub sublimuje, podawana jest temperatura, w której obserwowane są te efekty.

Należy podać wszystkie informacje i uwagi istotne dla interpretacji wyników, w szczególności w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu skupienia substancji.

4. **LITERATURA**

(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, 803–834.

(3) R. Weissberger éd.: 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, 505–515.

▼B

Dodatek

W celu uzyskania dodatkowych szczegółów technicznych można zapoznać się na przykład z następującymi normami.

1. **Metody kapilarne**

1.1. Urządzenia do pomiaru temperatury topnienia z łaźnią cieczową

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. Urządzenia do pomiaru temperatury topnienia z blokiem metalowym

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

2. **Płyty grzewcze**

2.1. Płyta grzewcza Koflera

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

2.2. Mikroskop do badania topnienia

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Metoda menisku (dla poliamidów)

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. Determination du „point de fusion” méthode du menisque

3. **Metody ustalania temperatury krzepnięcia**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
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 petrole: determination 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. **Analiza termiczna**

4.1. Różnicowa analiza termiczna

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. Różnicowa kalorymetria skaningowa

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. **Oznaczanie temperatury płynięcia**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du petrole: Point de trouble et point d'ecoulement 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 WRZENIA

1. METODA

Większość opisanych metod oparto na wytycznych OECD dotyczących badań (1). Podstawowe zasady podano w (2) i (3).

1.1. WPROWADZENIE

Urządzenia i metody tutaj opisane stosuje się do cieczy i nisko topliwych substancji, pod warunkiem że nie ulegają one reakcji chemicznej poniżej ich temperatury wrzenia (jak na przykład: samoutlenieniu, wtórnemu przekształceniu, rozkładowi i tak dalej). Metody te mogą być stosowane do czystych i zanieczyszczonych ciekłych substancji.

Kładzie się nacisk na metody wykorzystujące wykrywanie za pomocą komórki fotoelektrycznej i analizę termiczną, ponieważ metody te pozwalają na oznaczenie zarówno temperatury topnienia jak i temperatury wrzenia. Ponadto, pomiary mogą być wykonywane w sposób automatyczny.

„Metoda dynamiczna” ma tę zaletę, że można ją także wykorzystywać do oznaczenia ciśnienia pary i nie jest konieczna korekcja temperatury wrzenia do ciśnienia normalnego (101,325 kPa), gdyż można regulować ciśnienie normalne podczas pomiaru.

Uwagi:

Wpływ zanieczyszczeń na oznaczanie temperatury wrzenia w dużym stopniu zależy od charakteru zanieczyszczenia. Jeżeli w próbce znajdują się lotne zanieczyszczenia mogące wpływać na wyniki, badaną substancję należy oczyścić.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Temperatura wrzenia normalna jest zdefiniowana jako temperatura, przy której prężność pary cieczy wynosi 101,325 kPa.

Jeżeli temperatura wrzenia nie jest mierzona w normalnym ciśnieniu atmosferycznym, zależność prężności pary od temperatury opisuje się równaniem Clausiusa – Clapeyrona:

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

gdzie:

P = prężność pary substancji w paskalach,

ΔH_V = jej ciepło parowania w J mol^{-1},

R = uniwersalna molowa stała gazowa = 8,314 J mol^{-1} K^{-1},

T = temperatura termodynamiczna w stopniach K.

Temperatura wrzenia jest ustalona w odniesieniu do ciśnienia otoczenia w czasie trwania pomiaru.

▼B

Konwersje

Ciśnienie (jednostki: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(jednostka „bar” jest wciąż dozwolona, ale nie jest zalecana)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 tor

(jednostki „mm H” i „Torr” nie są dozwolone)

1 atm = standardowa atmosfera = 101 325 Pa

(jednostka „atm” jest niedozwolona)

Temperatura (jednostki: K)

t = T - 273,15

t: temperatura Celsjusza, stopień Celsjusza (^{o}C)

T: temperatura termodynamiczna, Kelwin (K)

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

Niektóre substancje kalibracyjne wymieniono w opisach metod wymienionych w dodatku.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Pięć metod ustalania temperatury wrzenia (zakresu wrzenia) jest oparte na pomiarze temperatury wrzenia, dwie inne oparte są o analizę termiczną.

1.4.1. **Wyznaczanie za pomocą ebuliometru**

Ebuliometry zostały pierwotnie opracowane w celu oznaczania masy cząsteczkowej poprzez podwyższanie temperatury wrzenia, jednak nadają się także do dokładnych pomiarów tej temperatury. Bardzo prosty przyrząd opisano w ASTM D 1120-72 (zob. dodatek). Ciecz jest podgrzewana w tym przyrządzie w warunkach równowagi, pod ciśnieniem atmosferycznym, do wrzenia.

1.4.2. **Metoda dynamiczna**

Metoda ta obejmuje pomiar temperatury ponownej kondensacji pary przy pomocy właściwego termometru w wykroplinach podczas wrzenia. Podczas stosowania tej metody ciśnienie może być zmienne.

1.4.3. **Metoda destylacji dla wyznaczania temperatury wrzenia**

Metoda ta obejmuje destylację cieczy i pomiar temperatury ponownej kondensacji pary oraz oznaczenie ilości destylatu.

▼B

1.4.4. **Metoda według Siwolobowa**

Próbkę podgrzewa się w probówce, która jest zanurzona w cieczy w gorącej łaźni. W probówce zanurzona jest z kolei zatopiona na końcu rurka kapilarna, zawierająca pęcherzyk powietrza w dolnej części.

1.4.5. **Wykrywanie przy pomocy komórki fotoelektrycznej**

Zgodnie z zasadą według Siwolobowa wykonuje się automatyczny pomiar fotoelektryczny z wykorzystaniem unoszących się pęcherzyków.

1.4.6. **Różnicowa analiza termiczna**

Niniejsza technika rejestruje różnicę w temperaturach między substancją i materiałem odniesienia jako funkcję temperatury, gdy substancja oraz materiał odniesienia podlegają temu samemu programowi kontrolowania temperatury. W momencie gdy próbka podlega przejściu pociągającym za sobą zmianę entalpii, zmiana ta jest wskazywana przez endotermiczne odchylenie (wrzenie) od linii bazowej zapisu temperatury.

1.4.7. **Różnicowa kalorymetria skaningowa**

Niniejsza technika rejestruje różnicę w energii pobranej przez substancję oraz materiał odniesienia, jako funkcję temperatury, gdy substancja oraz materiał odniesienia podlegają temu samemu programowi kontrolowania temperatury. Niniejsza energia jest energią konieczną do ustalenia zerowej różnicy temperatury między substancją i materiałem odniesienia. W momencie gdy próbka podlega przejściu pociągającym za sobą zmianę entalpii, zmiana ta jest wskazywana przez endotermiczne odchylenie (wrzenie) od linii bazowej zapisu przepływu ciepła.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Zastosowanie i dokładność różnych metod wykorzystywanych do ustalania temperatury wrzenia/zakres temperatury wrzenia przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Porównanie metod

Metoda pomiaru	Założona dokładność	Istniejąca norma
Ebuliometr	± 1,4 K (do 313 K) (1) (2) ± 2,5 K (do 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Metody dynamiczne	± 0,5 K (do 600 K) (2)	
Proces destylacji (zakres wrzenia)	± 0,5 K (do 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Według Siwolobowa	± 2 K (do 600 K) (2)	
Wykrywanie za pomocą komórki fotoelektrycznej	± 0,3 K (do 373 K) (2)	
Różnicowa kalorymetria termiczna	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76
Różnicowa kalorymetria skaningowa	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Niniejsza dokładność obowiązuje tylko dla prostego urządzenia, jak na przykład opisano w ASTM Dl 120-72; można ją poprawić bardziej złożonymi urządzeniami ebuliometru.
(2) Ważna jedynie dla czystych substancji. Użycie w innych okolicznościach powinno być uzasadnione.

▼B

1.6. OPIS METOD

Procedury dotyczące niektórych metod badania opisano w normach międzynarodowych i krajowych (zob. dodatek).

1.6.1. **Ebuliometr**

Zob. dodatek

1.6.2. **Metoda dynamiczna**

Zob. metoda badania A.4 dla oznaczania prężności pary.

Odnotowuje się temperaturę wrzenia stwierdzoną pod przyłożonym ciśnieniem 101,325 kPa.

1.6.3. **Proces destylacji (zakres wrzenia)**

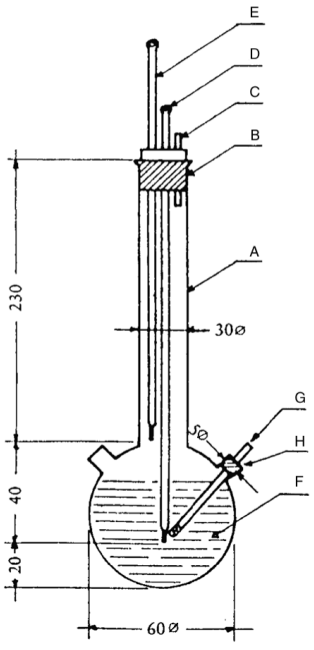
Zob. dodatek.

1.6.4. **Metoda według Siwolobowa**

Próbka jest podgrzewana w przyrządzie do oznaczania temperatury topnienia w probówce o średnicy około 5 mm (rysunek 1).

Rysunek 1 pokazuje rodzaj znormalizowanego przyrządu do badania temperatury topnienia i wrzenia (JIS K 0064) (wykonanego ze szkła, wszystkie wymiary w milimetrach).

Rysunek 1



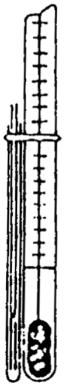
A: Naczynie pomiarowe
B: Korek
C: Odpowietrzenie
D: Termometr
E: Termometr pomocniczy
F: Łaźnia cieczowa
G: Probówka do próbek, średnica zewn. maks. 5 mm; zawierająca rurkę kapilarną długą na około 100 mm, średnica wewnętrzna około 1 mm i grubości ścianek około 0,2 do 0,3 mm
H: Rurka boczna

Rurkę kapilarną (kapilara do badania wrzenia), zatopioną na wysokości około 1 cm powyżej dolnego końca, umieszcza się w probówce. Badaną substancję wprowadza się w ten sposób, aby zatopiony odcinek kapilary znalazł się poniżej powierzchni cieczy. Probówkę zawierającą kapilarę albo przymocowuje się do termometru przy pomocy taśmy gumowej, albo umocowuje z boku na wsporniku (zob. rysunek 2).

▼B

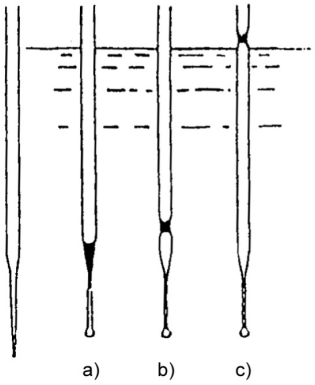
Rysunek 2

Zasada według Siwolobowa



Rysunek 3

Zmodyfikowana zasada



Ciecz do łaźni należy wybrać w zależności od temperatury wrzenia. Przy temperaturach do 573 K stosuje się olej silikonowy. Ciekła parafina jest stosowana tylko do 473 K. Początkowo grzanie łaźni cieczowej ustawia się na wzrost temperatury 3 K/min. Ciecz łaźni musi być mieszana. W temperaturze około 10 K poniżej spodziewanej temperatury wrzenia szybkość wzrostu temperatury ustawia się na maksimum 1 K/min. Przy zbliżaniu się do temperatury wrzenia z wrzącej zawartości kapilary zaczynają unosić się pęcherzyki.

Temperatura wrzenia to temperatura, w której przy chwilowym schłodzeniu łańcuszek pęcherzyków przestaje powstawać i ciecz w kapilarze nagle zaczyna się unosić. Odpowiadający temu odczyt temperatury to temperatura wrzenia substancji.

W zmodyfikowanej zasadzie pomiaru (rysunek 3) temperatura wrzenia jest oznaczana w kapilarze od ustalania temperatury topnienia. Jest ona wyciągnięta do przewężenia o długości około 2 cm (a) i zassana jest w niej mała ilość próbki. Otwarty koniec cienkiej kapilary jest zamknięty poprzez obtopienie w taki sposób, że na jej końcu znajduje się mały pęcherzyk powietrza. Podczas ogrzewania w aparacie do ustalania temperatury topnienia (b), pęcherzyk powietrza rozszerza się. Temperaturze wrzenia odpowiada taka temperatura, przy której zatyczka z substancji badanej osiąga poziom powierzchni cieczy łaźni (c).

1.6.5. **Wykrywanie za pomocą komórki fotoelektrycznej**

Próbka jest ogrzewana w rurce kapilarnej umieszczonej wewnątrz podgrzewanego bloku metalowego.

Wiązka światła przechodzi poprzez odpowiednie otwory w bloku, poprzez badaną substancję na precyzyjnie skalibrowaną komórkę fotoelektryczną.

W czasie wzrostu temperatury próbki pojedyncze pęcherzyki powietrza pojawiają się w kapilarze. Gdy osiągnięta jest temperatura wrzenia, ilość pęcherzyków gwałtownie wzrasta. Powoduje to zmianę intensywności światła rejestrowanego przez komórkę fotoelektryczną i powoduje wysłanie sygnału zatrzymania do wskaźnika odczytującego temperaturę z platynowego termometru rezystancyjnego umieszczonego w bloku.

Niniejsza metoda jest szczególnie użyteczna, gdyż pozwala na oznaczania poniżej temperatury pokojowej do 253,15 K (-20 ^{o}C) bez żadnych zmian w przyrządzie. Przyrząd umieszcza się jedynie w łaźni chłodzącej.

▼B

1.6.6. **Analiza termiczna**

1.6.6.1. *Różnicowa analiza termiczna*

Zob. dodatek.

1.6.6.2. *Różnicowa kalorymetria skaningowa*

Zob. dodatek.

2. **DANE**

Przy niewielkich odchyleniach od ciśnienia normalnego (maksimum ± 5 kPa) temperaturę wrzenia normalizuje się do T_n na podstawie następującego wzoru równania Sidneya-Younga:

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

gdzie:

Δp = (101,325 – p) [uwaga na znak],

P = pomiar ciśnienia w kPa,

f_T = szybkość zmian temperatury wrzenia z ciśnieniem w K/Kpa,

T = zmierzona temperatura wrzenia w K,

T_n = temperatura wrzenia skorygowana do ciśnienia normalnego w K.

Współczynniki korekcji temperatury, f_T, i wzory na ich przybliżone obliczanie zawarto we wspomnianych wyżej normach międzynarodowych i krajowych dla wielu substancji.

Na przykład w metodzie DIN 53171 wymieniono następujące, przybliżone poprawki dla rozpuszczalników zawartych w farbach:

Tabela 2

Temperatura – współczynniki korekcji f_T

Temperatura T (K)	Współczynnik korekcji 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	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— zastosowana metoda,

— precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia) i wstępny etap oczyszczenia, jeśli wykonano,

— ocena dokładności.

Średnią co najmniej dwóch pomiarów znajdujących się w zakresie oszacowanej dokładności (zob. tabela 1) przedstawia się jako temperaturę wrzenia.

Należy podać zmierzone temperatury wrzenia i ich średnią, a także ciśnienie (ciśnienia), w którym (których) były wykonywane pomiary, w kPa. Najkorzystniej jest, gdy ciśnienie jest zbliżone do normalnego ciśnienia atmosferycznego.

Należy podać wszystkie informacje i uwagi istotne dla interpretacji wyników, w szczególności w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu skupienia substancji.

4. **LITERATURA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 final.

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

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

▼B

Dodatek

W celu uzyskania dodatkowych szczegółów technicznych można zapoznać się na przykład z następującymi normami.

1. **Ebuliometr**

1.1. Urządzenia do pomiaru temperatury topnienia z łaźnią cieczową

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

2. **Proces destylacji (zakres wrzenia)**

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: determination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Różnicowa analiza termiczna i różnicowa kalorymetria skaningowa**

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. GĘSTOŚĆ WZGLĘDNA

1. METODA

Większość opisanych metod oparto na wytycznych OECD dotyczących badań (1). Podstawowe zasady podano w pozycjach bibliograficznych (2) i (3).

1.1. WPROWADZENIE

Opisane metody oznaczania gęstości względnej stosują się do substancji stałych i płynnych, bez ograniczeń związanych z ich stopniem czystości. Różne metody możliwe do zastosowania wymieniono w tabeli 1.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Gęstość względna ciał stałych lub cieczy jest stosunkiem między masą objętości badanej substancji, ustaloną w 20 °C, oraz masą tej samej objętości wody, ustaloną w 4 °C. Gęstość względna jest bezwymiarowa.

Gęstość, ρ, substancji jest ilorazem masy, m, i jej objętości, v.

Gęstość, ρ, w układzie jednostek SI jest dana w kg/m^3.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA (1), (3)

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

1.4. ZASADA METOD

Stosowane są cztery klasy metod.

1.4.1. **Metody wyporu hydrostatycznego**

1.4.1.1. *Areometr* (dla substancji ciekłych)

Wystarczająco dokładne i szybkie oznaczenia gęstości można uzyskać przy użyciu areometrów pływakowych, które pozwalają na obliczenie gęstości cieczy na podstawie głębokości zanurzenia, przez odczyt na skali z podziałką.

1.4.1.2. *Waga hydrostatyczna* (dla substancji płynnych i stałych)

Różnicę między wagą badanej próbki zmierzoną w powietrzu i w odpowiedniej cieczy (na przykład w wodzie) wykorzystuje się do oznaczenia jej gęstości.

W przypadku ciał stałych zmierzona gęstość jest charakterystyczna jedynie dla określonej, zastosowanej próbki. W przypadku oznaczania gęstości cieczy, ich ilość o znanej objętości, v, waży się najpierw w powietrzu, a potem w cieczy.

1.4.1.3. *Metoda zanurzeniowa* (dla substancji ciekłych) (4)

Metoda ta polega na oznaczaniu gęstości cieczy na podstawie różnicy między wynikami zważenia cieczy przed i po zanurzeniu w nim ciała o znanej objętości.

▼B

1.4.2. **Metody piknometryczne**

W przypadku ciał stałych lub cieczy można się posłużyć piknometrami o różnych kształtach i o znanych wymiarach. Gęstość oblicza się na podstawie różnicy masy między napełnionym i pustym piknometrem oraz jego znanej objętości.

1.4.3. **Piknometr wykonujący pomiar porównawczy w powietrzu** (dla ciał stałych)

Gęstość ciała stałego w dowolnej formie można zmierzyć w temperaturze pokojowej przy użyciu piknometru wykonującego pomiary porównawcze w gazie. Objętość substancji mierzy się w powietrzu lub w gazie obojętnym w cylindrze o zmiennej, wykalibrowanej objętości. Dla obliczenia gęstości wykonuje się jeden pomiar masy po zakończeniu pomiaru objętości.

1.4.4. **Densytometr oscylacyjny** (5, 6, 7)

Gęstość cieczy można zmierzyć przy pomocy densytometru oscylacyjnego. Mechaniczny oscylator skonstruowany w postaci U-rurki drga w częstotliwości rezonansowej zależnej od jego masy. Wprowadzenie badanej próbki zmienia częstotliwość rezonansową oscylatora. Przyrząd należy skalibrować przy użyciu dwóch substancji płynnych o znanej gęstości. Najkorzystniej, aby substancje te wybrać tak, aby ich gęstości były bliskie zakresowi, który ma być mierzony.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Zastosowania poszczególnych metod wykorzystywanych do oznaczania gęstości względnej wymieniono w tabeli.

1.6. OPIS METOD

W dodatku załączono normy podane jako przykłady, z którymi należy się zapoznać w celu uzyskania informacji o dodatkowych szczegółach technicznych.

Badania należy przeprowadzać w temperaturze 20 ^{o}C, przy czym konieczne jest wykonanie co najmniej dwóch pomiarów.

2. **DANE**

Zob. normy.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— zastosowana metoda,

— precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia) i wstępny etap oczyszczania, jeśli wykonano.

Gęstość względną, D_4^{20}, należy podawać w sposób określony w ppkt 1.2, łącznie ze stanem skupienia mierzonej substancji.

Należy podać wszystkie informacje i uwagi istotne dla interpretacji wyników, w szczególności w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu skupienia substancji.

▼B

Tabela

Zastosowanie metod

Metoda pomiaru	Gęstość		Maksymalna możliwa lepkość dynamiczna	Istniejące normy
	ciało stałe	ciecz		
1.4.1.1. Areometr		tak	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Waga hydrostatyczna				
a) ciała stałe	tak			ISO 1183 (A)
b) ciecze		tak	5 Pa s	ISO 901 i 758
1.4.1.3. Metoda zanurzeniowa		tak	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Piknometr				ISO 3507
a) ciała stałe	tak			ISO 1183(B), NF T 20-053
b) ciecze		tak	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Piknometr wykonujący pomiar porównawczy w powietrzu	tak			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Densytometr oscylacyjny		tak	5 Pa s	

4. **LITERATURA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test 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, 508.

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. 11, 427–430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 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, 717–726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digital en Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253–255.

▼B

Dodatek

Dla uzyskania dodatkowych szczegółów technicznych można zapoznać się na przykład z następującymi normami.

1. **Metody wyporu hydrostatycznego**

1.1. Aerometr

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardized 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. Waga hydrostatyczna

Dla substancji stałych

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

Dla substancji ciekłych

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 zanurzeniowa

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

2. **Metody piknometryczne**

2.1. Dla substancji ciekłych

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 ^{o}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 100,10^{-6} m^{2} s^{-1} at 15 ^{o}C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100,10-^{6} m^{2} s^{-1} at 20 ^{o}C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 ^{o}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 mineral 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.	Dla substancji stałych	
	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 solids in powder and liquids – Pyknometric method
	DIN 19683	Determination of the density of soils
3.	**Piknometr wykonujący pomiar porównawczy w powietrzu**	
	DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichrungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
	DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. PRĘŻNOŚĆ PARY

1. METODA

Niniejsza metoda odpowiada wytycznej OECD TG 104 (2004).

1.1. WSTĘP

Niniejsza zmieniona wersja metody A.4 (1) zawiera jedną dodatkową metodę: metodę efuzji, opartą na termograwimetrii izotermicznej, przeznaczoną do substancji chemicznych o bardzo niskich ciśnieniach (do 10^{-10} Pa). Wobec zapotrzebowania na procedury, zwłaszcza dotyczące wyznaczania ciśnienia pary dla substancji o bardzo niskim ciśnieniu pary, dokonano ponownej oceny innych procedur niniejszej metody pod względem zakresu stosowalności.

W stanie równowagi termodynamicznej ciśnienie pary substancji czystej jest jedynie funkcją temperatury. Podstawowe zasady opisano w innym miejscu (2)(3).

Nie ma jednej procedury pomiarowej, która miałaby zastosowanie do całego zakresu ciśnień pary, od poniżej 10^{-10} aż do 10^5 Pa. Niniejsza metoda obejmuje osiem metod pomiaru ciśnienia pary, które mogą być stosowane w różnych zakresach ciśnienia. Porównanie poszczególnych metod pod względem zastosowania i zakresu pomiarowego przedstawiono w tabeli 1. Metody te można stosować tylko do związków, które nie rozkładają się w warunkach badania. W przypadkach gdy ze względów technicznych nie można zastosować metod doświadczalnych, ciśnienie pary można również oszacować, a zalecaną metodę szacowania przedstawiono w dodatku.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Ciśnienie pary substancji określa się jako ciśnienie nasycenia nad substancją w stanie stałym lub ciekłym.

Należy używać jednostki ciśnienia obowiązującej w układzie SI, którą jest paskal (Pa). Poniżej podano inne jednostki, które były stosowane historycznie, wraz z ich współczynnikami przeliczeniowymi:

1 tor = 1 mm Hg = $1{,}333 \times 10^2$ Pa

1 atmosfera = $1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 bar = 10^5 Pa

Jednostką temperatury w układzie SI jest kelwin (K). Przeliczenia stopni Celsjusza na kelwiny dokonuje się według wzoru:

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

gdzie T jest temperaturą w skali Kelwina lub temperaturą termodynamiczną, zaś t jest temperaturą w skali Celsjusza.

▼**M1**

Tabela 1

Metoda pomiarowa	Substancje		Szacowana powtarzalność	Szacowana odtwarzalność	Zalecany zakres
	Stałe	Ciekłe			
Metoda dynamiczna	Łatwotopliwe	Tak	do 25 % 1–5 %	do 25 % 1–5 %	10^3 Pa do 2 × 10^3 Pa 2 × 10^3 Pa do 10^5 Pa
Metoda statyczna	Tak	Tak	5–10 %	5–10 %	10 Pa do 10^5 Pa 10^{-2} Pa do 10^5 Pa (1)
Metoda izoteniskopowa	Tak	Tak	5–10 %	5–10 %	10^2 Pa do 10^5 Pa
Metoda efuzji: równowaga ciśnienia pary	Tak	Tak	5–20 %	do 50 %	10^{-3} do 1 Pa
Metoda efuzji: komórka Knudsena	Tak	Tak	10–30 %	—	10^{-10} do 1 Pa
Metoda efuzji: grawimetria izotermiczna	Tak	Tak	5–30 %	do 50 %	10^{-10} do 1 Pa
Metoda nasycania gazu	Tak	Tak	10–30 %	do 50 %	10^{-10} do 10^3 Pa
Metoda wirującego rotora	Tak	Tak	10–20 %	—	10^{-4} do 0,5 Pa

(1) Używając manometru pojemnościowego.

1.3. ZASADA BADANIA

Na ogół ciśnienie pary wyznacza się w różnych temperaturach. W ograniczonym zakresie temperatury logarytm ciśnienia pary substancji czystej jest liniową funkcją odwrotności temperatury termodynamicznej, zgodnie z uproszczonym równaniem Clapeyrona-Clausiusa:

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

gdzie:

p = ciśnienie pary w paskalach,

ΔHv = ciepło parowania w J mol^{-1},

R = uniwersalna stała gazowa: 8,314 J mol^{-1} K^{-1},

T = temperatura w K.

▼**M1**

1.4. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma potrzeby stosowania substancji odniesienia. Służą one głównie do sporadycznego sprawdzenia działania metody, jak również do umożliwienia porównania wyników uzyskanych różnymi metodami.

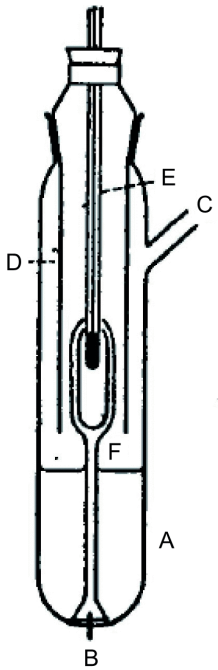
1.5. OPIS METODY

1.5.1. **Metoda dynamiczna (metoda Cottrella)**

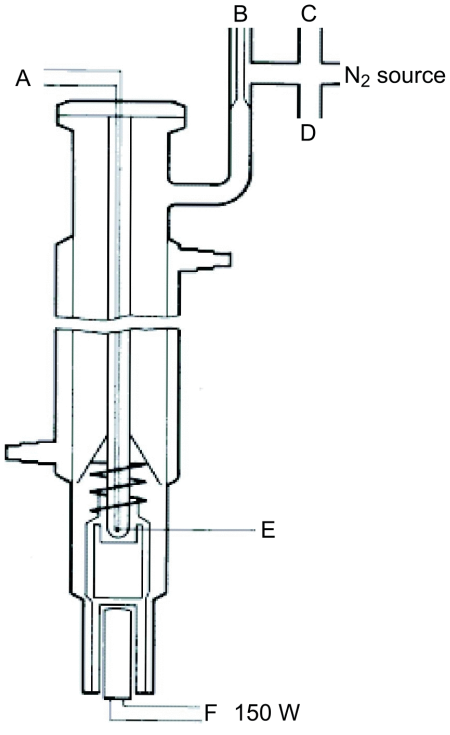
1.5.1.1. *Zasada*

Ciśnienie pary wyznacza się, mierząc temperaturę wrzenia substancji przy różnych określonych wartościach ciśnienia w przybliżonych granicach od 10^3 do 10^5 Pa. Metoda ta jest również zalecana do wyznaczania temperatury wrzenia. Do tego celu jest ona użyteczna do temperatury 600 K. Temperatury wrzenia cieczy są o około 0,1 °C wyższe na głębokości 3 do 4 cm niż na powierzchni z powodu ciśnienia słupa cieczy. W metodzie Cottrella (4) termometr umieszcza się w parze powyżej powierzchni cieczy tak, iż wrząca ciecz w sposób ciągły omywa zbiornik termometru. Zbiornik termometru pokrywa cienka warstwa cieczy, która jest w równowadze z parą pod ciśnieniem atmosferycznym. W ten sposób termometr wskazuje rzeczywistą temperaturę wrzenia, bez błędów powodowanych przegrzaniem lub ciśnieniem hydrostatycznym. Pompę pierwotnie zastosowaną przez Cottrella przedstawiono na rysunku 1. Rurka A zawiera wrzącą ciecz. Wtopiony w dno platynowy drut B ułatwia równomierne wrzenie. Boczna rurka C prowadzi do skraplacza, zaś osłona D zapobiega przedostawaniu się zimnych skroplin do termometru E. Podczas wrzenia cieczy zawartej w rurce A wychwycone przez lejek pęcherzyki i ciecz są wylewane poprzez dwa ramiona pompki F na zbiornik termometru.

Rysunek 1



Rysunek 2



▼**M1**

Pompa Cottrella (4)

A: Termopara

B: Próżniowa objętość buforowa

C: Ciśnieniomierz

D: Próżnia

E: Punkt pomiarowy

F: Element grzewczy ok. 150 W

1.5.1.2. *Przyrząd*

Na rysunku 2 przedstawiono bardzo dokładny przyrząd wykorzystujący zasadę Cottrella. Składa się on z rurki z sekcją wrzenia w dolnej części, chłodnicą w części środkowej oraz wylotem i kołnierzem w części górnej. Pompa Cottrella jest umieszczona w sekcji wrzenia, która jest ogrzewana za pomocą wkładu elektrycznego. Temperatura jest mierzona przez termoparę z osłoną lub termometr oporowy wprowadzony poprzez kołnierz u góry. Wylot jest podłączony do układu regulacji ciśnienia. Układ ten zawiera pompę próżniową, objętość buforową, manostat do wpuszczania azotu celem regulacji ciśnienia oraz manometr.

1.5.1.3. *Procedura*

Substancję umieszcza się w sekcji wrzenia. W przypadku niesproszkowanych ciał stałych można napotkać problemy, lecz niekiedy można je rozwiązać, ogrzewając płaszcz chłodzący. Przyrząd zamyka się szczelnie na kołnierzu, a substancję poddaje się odgazowaniu. Metoda ta nie nadaje się do pomiaru substancji pieniących się.

Następnie nastawia się najniższe żądane ciśnienie i włącza się ogrzewanie. Równocześnie czujnik temperatury podłącza się do rejestratora.

Równowaga jest osiągnięta, gdy przy stałym ciśnieniu rejestrowana jest stała temperatura wrzenia. Należy zachować szczególną ostrożność, aby nie dopuścić do uderzenia podczas wrzenia. Ponadto musi nastąpić całkowite skroplenie na chłodnicy. Podczas oznaczania ciśnienia pary łatwotopliwych substancji stałych należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do zablokowania skraplacza.

Po zarejestrowaniu punktu równowagi nastawia się wyższe ciśnienie. Proces kontynuuje się w ten sposób aż do osiągnięcia ciśnienia 10^5 Pa (uzyskując ogółem około 5 do 10 punktów pomiarowych). Dla sprawdzenia należy powtórzyć punkty równowagi przy malejących ciśnieniach.

1.5.2. **Metoda statyczna**

1.5.2.1. *Zasada*

W metodzie statycznej (5) ciśnienie pary w stanie równowagi termodynamicznej wyznacza się w określonej temperaturze. Metoda ta nadaje się do substancji i cieczy wieloskładnikowych oraz ciał stałych w przedziale od 10^{-1} do 10^5 Pa, a pod warunkiem zachowania staranności również w przedziale od 1 do 10 Pa.

▼M1

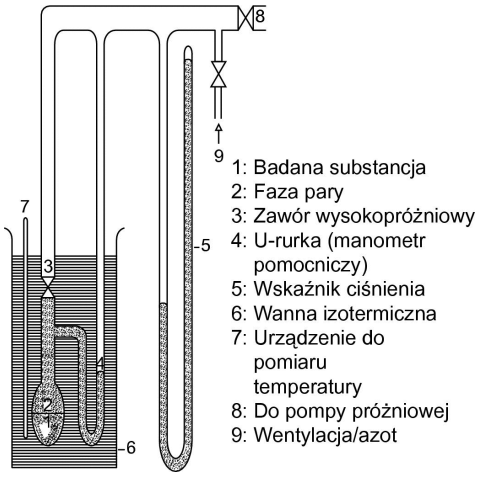
1.5.2.2. *Przyrząd*

Przyrząd pomiarowy składa się z łaźni stałotemperaturowej (dokładność ± 0,2 K), pojemnika na próbkę podłączonego do przewodu próżniowego, manometru oraz układu do regulacji ciśnienia. Komora próbki (rysunek 3a) jest podłączona do przewodu próżniowego poprzez zawór i manometr różnicowy (U-rurkę zawierającą odpowiednią ciecz manometryczną), który służy jako wskaźnik zera. Do zastosowania w manometrze różnicowym nadają się: rtęć, silikony i ftalany, w zależności od zakresu ciśnienia i zachowania się badanej substancji pod względem chemicznym. Ze względu na ochronę środowiska naturalnego należy w miarę możliwości unikać stosowania rtęci. Badana substancja nie może w dostrzegalny sposób rozpuszczać się w cieczy zawartej w U-rurce ani wchodzić z nią w reakcje. Zamiast U-rurki można użyć ciśnieniomierza (rysunek 3b). W manometrze można stosować rtęć w zakresie od ciśnienia normalnego do 10^2 Pa, natomiast płyny silikonowe i ftalany nadają się do użycia w zakresie ciśnienia poniżej 10^2 Pa aż do 10 Pa. Istnieją inne ciśnieniomierze, których można używać przy ciśnieniu poniżej 10^2 Pa, zaś podgrzewanych przeponowych manometrów pojemnościowych można używać nawet przy ciśnieniu poniżej 10^{-1} Pa. Temperaturę mierzy się na zewnętrznej ścianie zbiornika zawierającego próbkę lub w samym zbiorniku.

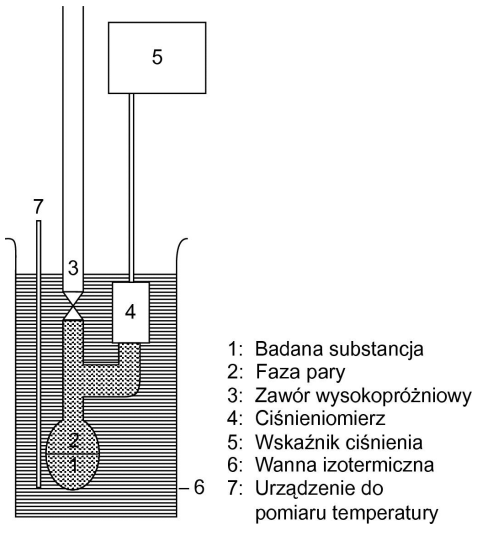
1.5.2.3. *Procedura*

Używając przyrządu przedstawionego na rysunku 3a, napełnić U-rurkę wybraną cieczą, którą przed dokonaniem odczytów należy odgazować w podwyższonej temperaturze. Badaną substancję umieszcza się w przyrządzie i odgazowuje w obniżonej temperaturze. W przypadku próbki wieloskładnikowej temperatura powinna być dostatecznie niska dla zapewnienia, że skład materiału nie ulegnie zmianie. Równowagę można osiągnąć szybciej dzięki mieszaniu. Próbkę można schłodzić za pomocą ciekłego azotu lub suchego lodu, lecz należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do skroplenia powietrza lub cieczy pompy. Przy otwartym zaworze nad zbiornikiem próbki włącza się na kilka minut zasysanie, aby usunąć powietrze. W razie potrzeby operację odgazowania powtarza się wielokrotnie.

Rysunek 3a



Rysunek 3b



▼M1

Gdy próbka jest podgrzewana przy zamkniętym zaworze, ciśnienie pary wzrasta. Powoduje to zmianę równowagi cieczy w U-rurce. Aby skompensować tę zmianę, do przyrządu wprowadza się azot lub powietrze, aż do ponownego wyzerowania się różnicowego wskaźnika ciśnienia. Wymagane do tego ciśnienie można odczytać z manometru lub z przyrządu o wyższej dokładności. Ciśnienie to odpowiada ciśnieniu pary substancji w temperaturze pomiaru. Używając przyrządu przedstawionego na rysunku 3b, ciśnienie pary odczytuje się bezpośrednio.

Ciśnienie pary wyznacza się w odpowiednio małych odstępach czasu (w sumie około 5–10 punktów pomiarowych) aż do żądanego maksimum temperatury.

Dla sprawdzenia należy powtórzyć odczyty przy malejącej temperaturze. Jeżeli wartości otrzymane z powtórzonych odczytów nie pokrywają się z krzywą uzyskaną dla temperatury rosnącej, to może to wynikać z jednej z następujących sytuacji:

(i) próbka nadal zawiera powietrze (np. w przypadku substancji o dużej lepkości) lub substancje o niskiej temperaturze wrzenia, wydzielające się podczas ogrzewania;

(ii) substancja ulega reakcji chemicznej w badanym zakresie temperatury (np. rozkładowi, polimeryzacji).

1.5.3. **Metoda z użyciem izoteniskopu**

1.5.3.1. *Zasada*

Izoteniskop (6) oparty jest na zasadzie metody statycznej. Metoda ta polega na umieszczeniu próbki w bańce utrzymywanej w stałej temperaturze i podłączonej do manometru oraz pompy próżniowej. Zanieczyszczenia bardziej lotne od badanej substancji usuwa się przez odgazowanie przy obniżonym ciśnieniu. Ciśnienie pary próbki w wybranych temperaturach jest równoważone znanym ciśnieniem gazu obojętnego. Izoteniskop został skonstruowany do pomiaru ciśnienia pary pewnych ciekłych węglowodorów, lecz nadaje się również do badania substancji stałych. Metoda ta zwykle nie nadaje się do układów wieloskładnikowych. Wyniki obciążone są jedynie nieznacznym błędem w przypadku próbek zawierających zanieczyszczenia nielotne. Zalecany zakres wynosi od 10^2 do 10^5 Pa.

1.5.3.2. *Przyrząd*

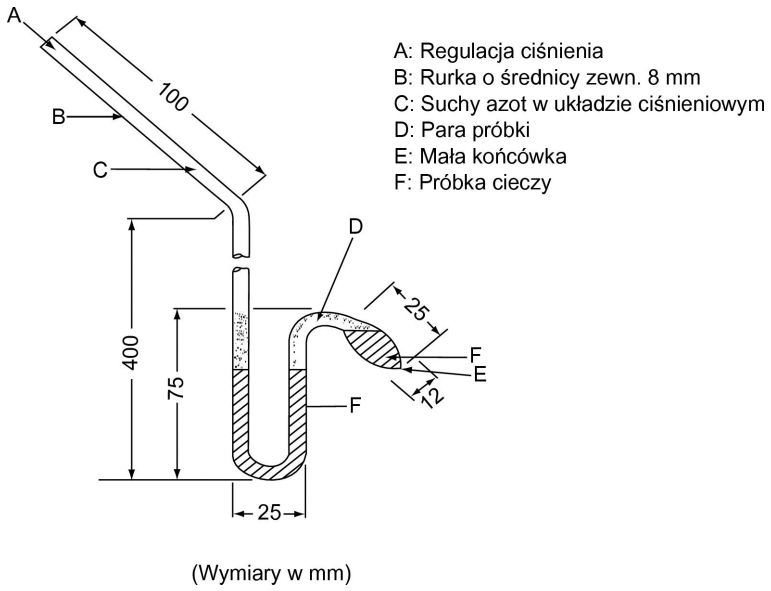
Przykład urządzenia pomiarowego przedstawiono na rysunku 4. Pełny opis można znaleźć w ASTM D 2879–86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Procedura*

W przypadku cieczy badana substancja sama służy jako płyn w manometrze różnicowym. Do izoteniskopu wprowadza się ilość cieczy wystarczającą do wypełnienia bańki i krótszego ramienia manometru. Izoteniskop przyłącza się do układu próżniowego i usuwa z niego powietrze, a następnie napełnia azotem. Opróżnianie i oczyszczanie układu powtarza się dwukrotnie, aby usunąć resztki tlenu. Napełniony izoteniskop ustawia się w położeniu poziomym, tak aby próbka rozłożyła się cienką warstwą w bańce próbnej i manometrze. Ciśnienie w układzie obniża się do 133 Pa, a próbkę łagodnie się ogrzewa, aż zacznie wrzeć (usunięcie rozpuszczonych gazów). Następnie izoteniskop ustawia się, tak aby próbka powróciła do bańki i napełniła krótsze ramię manometru. Ciśnienie utrzymywane jest na poziomie 133 Pa. Wyciąganą końcówkę bańki próbkowej podgrzewa się małym płomieniem, aż wydzielona z próbki para rozpręży się dostatecznie, aby wyprzeć część próbki z górnej części bańki i ramienia manometru, tworząc wypełnioną parą przestrzeń wolną od azotu. Izoteniskop umieszcza się następnie w łaźni stałotemperaturowej, a ciśnienie azotu nastawia się, tak aby równe było ciśnieniu próbki. W stanie równowagi ciśnienie azotu równe jest ciśnieniu pary substancji.

Rysunek 4



(Wymiary w mm)

W przypadku substancji stałych i w zależności od zakresu ciśnienia i temperatury stosuje się ciecze manometryczne, takie jak płyny silikonowe lub ftalany. Odgazowaną ciecz manometryczną umieszcza się w bańce wykonanej na długim ramieniu izoteniskopu. Następnie badaną substancję stałą wkłada się do bańki próbkowej i odgazowuje w podwyższonej temperaturze. Po wykonaniu tego izoteniskop przechyla się, tak aby ciecz manometryczna mogła wpłynąć do U-rurki.

▼M1

1.5.4. **Metoda efuzji: równowaga ciśnienia pary** (7)

1.5.4.1. *Zasada*

Próbkę badanej substancji ogrzewa się w małym piecu i umieszcza w dzwonie szklanym, w którym wytworzono próżnię. Piec przykryty jest pokrywą, która posiada niewielkie otwory o znanej średnicy. Ulatniająca się przez otwory para substancji kierowana jest na szalę wagi o wysokiej czułości, która również jest zamknięta w opróżnionym dzwonie szklanym. W niektórych rozwiązaniach konstrukcyjnych szala wagi umieszczona jest w komorze chłodzącej, która zapewnia odprowadzenie ciepła na zewnątrz. Promieniowanie powoduje ochłodzenie szali wagi, tak iż ulatniająca się para skrapla się na niej. Pęd strumienia pary działa na szalę jak siła. Ciśnienie pary można wyprowadzić dwoma sposobami: bezpośrednio z siły działającej na szalę wagi oraz z szybkości parowania przy użyciu równania Hertza-Knudsena (2):

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

gdzie:

G = szybkość parowania (kg s^{-1} m^{-2}),

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

T = temperatura (K),

R = uniwersalna stała gazowa (J mol^{-1} K^{-1}),

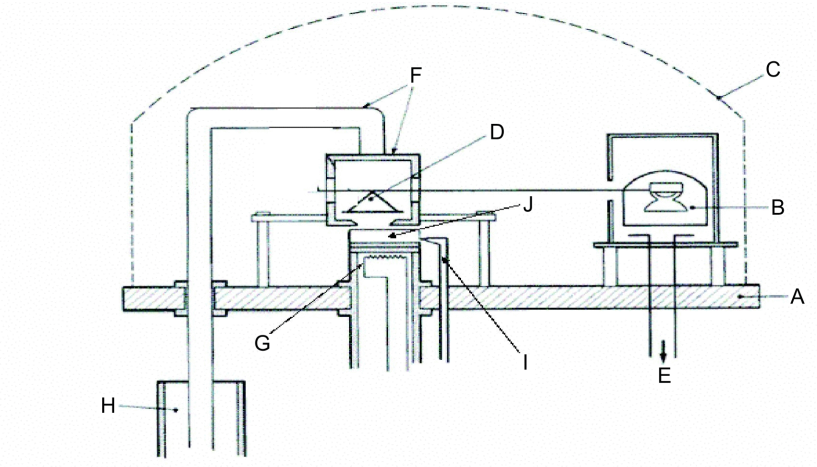
P = ciśnienie pary (Pa).

Zalecany zakres wynosi od 10^{-3} do 1 Pa.

1.5.4.2. *Przyrząd*

Schemat ideowy przyrządu pomiarowego zilustrowano na rysunku 5.

Rysunek 5



A: Płyta podstawy

B: Przyrząd z ruchomą cewką

C: Dzwon szklany

D: Waga z szalą

E: Urządzenie do pomiaru próżni

F: Komora chłodząca i pręt chłodzący

G: Piec wyparki

H: Naczynie Dewara z ciekłym azotem

I: Pomiar temperatury próbki

J: Badana substancja

▼M1

1.5.5. **Metoda efuzji: komórka Knudsena**

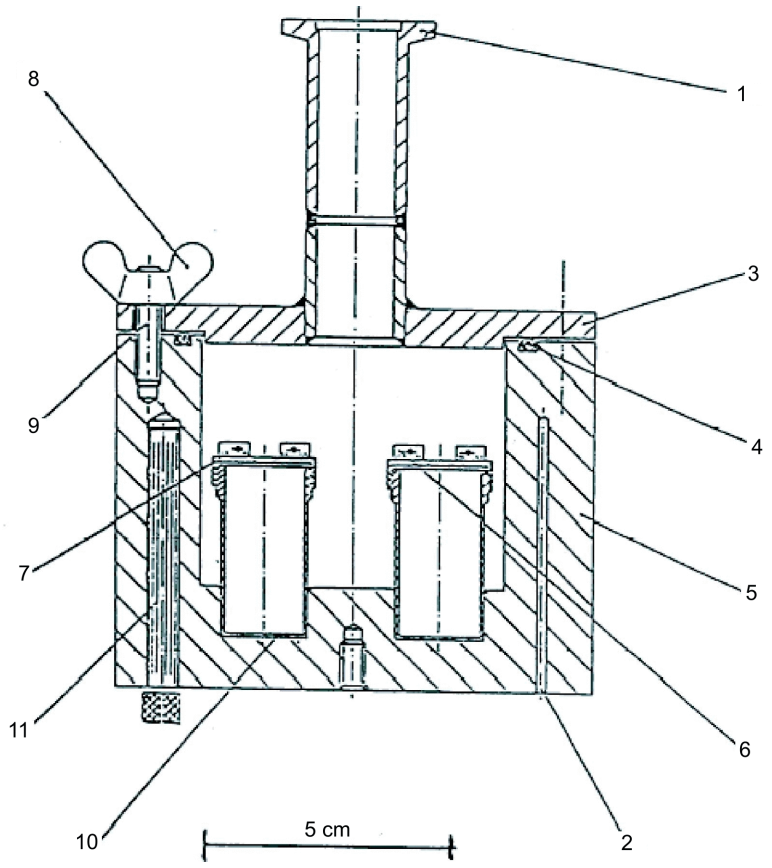
1.5.5.1. *Zasada*

Metoda ta polega na oszacowaniu masy badanej substancji w postaci pary wypływającej w jednostce czasu z komórki Knudsena (8) przez mikrootwór w warunkach wysokiej próżni. Masę pary, która wypłynęła, można określić poprzez wyznaczenie straty masy komórki lub przez skroplenie pary w niskiej temperaturze i wyznaczenie masy ulotnionej substancji przy pomocy chromatografii. Ciśnienie pary oblicza się stosując zależność Hertza-Knudsena (zob. sekcja 1.5.4.1) ze współczynnikami korekcji w zależności od parametrów przyrządu pomiarowego (9). Zalecany zakres wynosi od 10^{-10} do 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Przyrząd*

Schemat ideowy przyrządu pomiarowego zilustrowano na rysunku 6.

Rysunek 6



1: Podłączenie do układu próżniowego

2: Pochwy platynowego termometru oporowego lub urządzenia do pomiaru i regulacji temperatury

3: Pokrywa zbiornika próżniowego

4: Pierścień uszczelniający (O-ring)

5: Aluminiowy zbiornik próżniowy

6: Urządzenie do zakładania i wyjmowania komórek efuzyjnych

7: Pokrywa gwintowana

8: Nakrętki motylkowe

9: Śruby

10: Komórki efuzyjne ze stali nierdzewnej

11: Wkładka grzewcza

▼M1

1.5.6. **Metoda efuzji: termograwimetria izotermiczna**

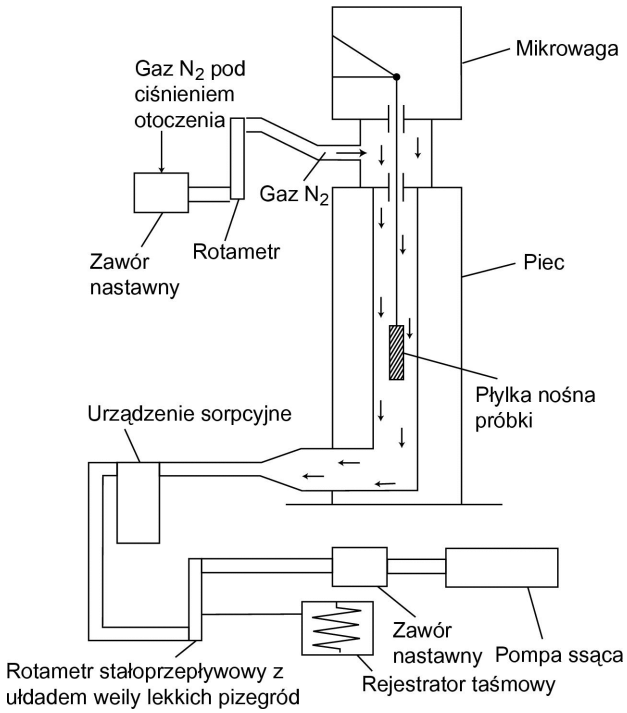
1.5.6.1. *Zasada*

Metoda ta polega na wyznaczeniu szybkości przyspieszonego parowania badanej substancji w podwyższonych temperaturach i pod ciśnieniem otoczenia przy pomocy grawimetrii (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Wartości szybkości parowania v_T otrzymuje się, poddając wybrany związek działaniu atmosfery powoli płynącego gazu obojętnego i obserwując utratę ciężaru w określonych, stałych temperaturach T (wyrażonych w kelwinach) w ciągu odpowiednich okresów. Wartości ciśnienia pary p_T oblicza się na podstawie wartości v_T przy użyciu liniowej zależności pomiędzy logarytmem ciśnienia pary i logarytmem szybkości parowania. W razie potrzeby można dokonać ekstrapolacji do temperatur 20 i 25 °C za pomocą analizy regresji log p_T w zależności od 1/T. Metoda ta nadaje się do substancji o ciśnieniu pary sięgającym minimum 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) i o czystości możliwie jak najbliższej 100 % dla uniknięcia błędnej interpretacji zmierzonych wartości utraty ciężaru.

1.5.6.2. *Przyrząd*

Schemat ideowy zestawu doświadczalnego przedstawiono na rysunku 7.

Rysunek 7



Płytka nośna próbki, zawieszona na mikrowadze w komorze o regulowanej temperaturze, jest omiatana strumieniem suchego gazowego azotu, który porywa odparowane cząsteczki badanej substancji. Po opuszczeniu komory strumień gazu jest oczyszczany przez urządzenie sorpcyjne.

1.5.6.3. *Procedura*

Badaną substancję nakłada się na powierzchnię chropowatej płytki szklanej w postaci jednorodnej warstwy. W przypadku substancji stałych płytkę zwilża się równomiernie roztworem substancji w odpowiednim rozpuszczalniku i suszy w atmosferze obojętnej. Do celu pomiaru pokrytą płytkę zawiesza się w analizatorze termograwimetrycznym, a następnie mierzy się w sposób ciągły utratę jej ciężaru w funkcji czasu.

▼M1

Szybkość parowania v_T w określonej temperaturze oblicza się na podstawie utraty ciężaru Δm płytki próbnej za pomocą wzoru:

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

gdzie F jest polem powierzchni nałożonej substancji badanej, zwykle równym polu powierzchni płytki próbnej, zaś t jest czasem utraty ciężaru Δm.

Ciśnienie pary p_T oblicza się na podstawie szybkości parowania v_T, za pomocą wzoru:

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

gdzie C i D są stałymi charakterystycznymi dla użytego zestawu doświadczalnego, zależnymi od średnicy komory pomiarowej i od natężenia przepływu gazu. Stałe te należy wyznaczyć raz poprzez wykonanie pomiaru dla grupy związków o znanym ciśnieniu pary i dokonanie regresji zależności log p_T od log v_T (11)(21)(22).

Zależność pomiędzy ciśnieniem pary p_T a temperaturą T w kelwinach jest dana wzorem:

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

gdzie A i B są stałymi uzyskanymi z regresji zależności log p_T od 1/T. Za pomocą tego równania można obliczyć ciśnienie pary dla dowolnej innej temperatury przez ekstrapolację.

1.5.7. **Metoda nasycania gazu** (23)

1.5.7.1. *Zasada*

Gaz obojętny o temperaturze pokojowej przepuszcza się przy znanym natężeniu przepływu przez próbkę badanej substancji lub ponad nią dostatecznie powoli, aby zapewnić nasycenie. Osiągnięcie nasycenia w fazie gazowej ma decydujące znaczenie. Przenoszona substancja jest wychwytywana (zwykle przy użyciu sorbentu), po czym określa się jej ilość. Alternatywnie wobec wychwytywania i analizy pary, do określenia ilości przenoszonego materiału można wykorzystać współbieżne techniki analityczne, np. chromatografię gazową. Ciśnienie pary oblicza się w oparciu o założenia, że zachowane jest prawo gazu doskonałego i że całkowite ciśnienie mieszaniny gazów jest równe sumie ciśnień gazów będących jej składnikami. Ciśnienie cząstkowe badanej substancji, tj. ciśnienie pary, oblicza się ze znanej całkowitej objętości gazu i masy przenoszonego materiału.

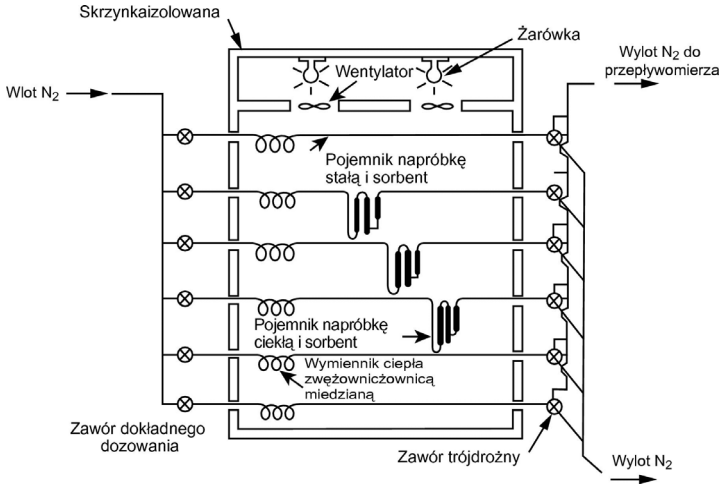
Procedura nasycania gazu ma zastosowanie do stałych lub ciekłych substancji chemicznych. Może być stosowana do ciśnień pary sięgających minimum 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Metoda ta jest najbardziej pewna dla ciśnień pary poniżej 10^3 Pa. Powyżej tej wartości ciśnienie pary jest zwykle oszacowywane zbyt wysoko, prawdopodobnie na skutek tworzenia się aerozolu. Ponieważ pomiary ciśnienia pary wykonuje się w temperaturze pokojowej, nie ma konieczności ekstrapolacji danych z wysokich temperatur i unika się wynikających stąd często poważnych błędów.

1.5.7.2. *Przyrząd*

Procedura wymaga użycia komory stałotemperaturowej. Szkic na rysunku 8 przedstawia komorę zawierającą po trzy pojemniki na próbki stałe i ciekłe, które umożliwiają potrojenie analizy próbki stałej substancji stałej lub ciekłej. Temperatura jest regulowana z dokładnością do ± 0,5 °C lub lepszą.

▼**M1**

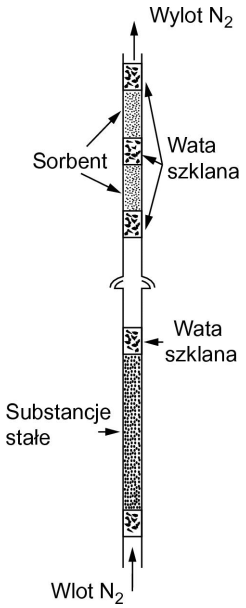
Rysunek 8



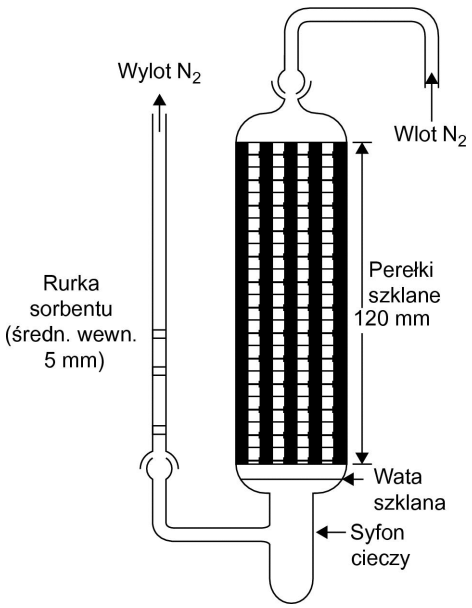
Zwykle jako obojętny gaz nośny używany jest azot, lecz niekiedy może być wymagany inny gaz (24). Gaz nośny musi być suchy. Strumień gazu zostaje rozdzielony na 6 strumieni regulowanych przez zawory iglicowe (o wielkości otworu ok. 0,79 mm) i wpływa do skrzynki poprzez rurkę miedzianą o średnicy wewnętrznej 3,8 mm. Po wyrównaniu się temperatury gaz przepływa przez próbkę i pułapkę sorbentową, a następnie wypływa z komory.

Próbki substancji stałych umieszcza się w rurce szklanej o średnicy wewnętrznej 5 mm pomiędzy korkami z waty szklanej (zob. rysunek 9). Rysunek 10 przedstawia pojemnik na próbkę ciekłą i układ sorbentu. Najwyższą odtwarzalność pomiaru ciśnienia pary cieczy zapewnia metoda polegająca na oblaniu cieczą perełek szklanych lub obojętnego sorbentu (np. krzemionki) i napełnieniu zbiornika tymi perełkami. Alternatywnie gaz nośny można przepuścić przez grubą frytę, a następnie w postaci pęcherzyków przez kolumnę z badaną substancją ciekłą.

Rysunek 9



Rysunek 10



▼**M1**

Układ sorbentu zawiera przednią i rezerwową sekcję sorbentu. Przy bardzo niskich ciśnieniach pary na sorbencie zatrzymywane są jedynie małe ilości i poważnym problemem może być adsorpcja na wełnie szklanej i rurce szklanej pomiędzy próbką a sorbentem.

Innym skutecznym sposobem zbierania odparowanego materiału są pułapki chłodzone stałym CO_2. Nie powodują one wstecznego ciśnienia na kolumnie saturatora, a ponadto łatwe jest wybranie wychwyconego materiału w sposób ilościowy.

1.5.7.3. *Procedura*

Natężenie przepływu wypływającego gazu nośnego mierzy się w temperaturze pokojowej. Natężenie przepływu jest często sprawdzane w trakcie doświadczenia w celu zapewnienia jego odpowiedniej wartości dla łącznej objętości gazu nośnego. Zaleca się pomiar ciągły za pomocą przepływomierza masowego. Nasycenie fazy gazowej może wymagać znacznego czasu kontaktu, a zatem dość niskiego natężenia przepływu gazu (25).

Na koniec doświadczenia analizę przeprowadza się oddzielnie dla przedniej i rezerwowej sekcji sorbentu. Związek w każdej sekcji desorbuje się przez dodanie rozpuszczalnika. Otrzymane w wyniku tego roztwory poddaje się analizie ilościowej w celu określenia masy zdesorbowanej z każdej sekcji. O wyborze metody analitycznej (a także o wyborze sorbentu i rozpuszczalnika desorbującego) decyduje charakter badanej substancji. Sprawność desorpcji wyznacza się przez wstrzyknięcie znanej ilości próbki do sorbentu, zdesorbowanie jej i przeprowadzenie analizy odzyskanej ilości. Ważne jest, aby sprawność desorpcji sprawdzić przy stężeniu próbki występującym w warunkach badania lub zbliżonym do niego.

Aby zapewnić nasycenie gazu nośnego badaną substancją stosuje się trzy różne natężenia przepływu. Jeżeli obliczone ciśnienie pary wykazuje brak zależności od natężenia przepływu, gaz uznaje się za nasycony.

Ciśnienie pary oblicza się przy pomocy równania:

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

gdzie:

p = ciśnienie pary (Pa),

W = masa odparowanej substancji (g),

V = objętość nasyconego gazu (m^3),

R = uniwersalna stała gazowa 8,314 (J mol^{-1} K^{-1}),

T = temperatura (K),

M = masa molowa badanej substancji (g mol^{-1}).

Zmierzone wartości należy skorygować pod względem różnic ciśnienia i temperatury pomiędzy przepływomierzem a saturatorem.

▼M1

1.5.8. **Wirujący rotor**

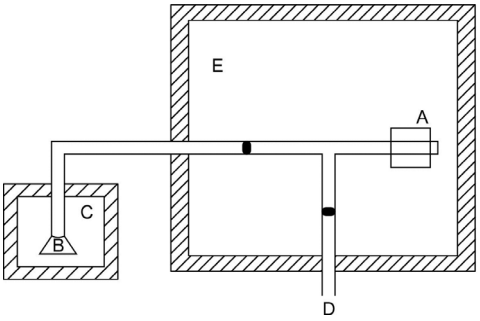
1.5.8.1. *Zasada*

Metoda ta wykorzystuje lepkościomierz z wirującym rotorem, w którym elementem pomiarowym jest kulka stalowa zawieszona w polu magnetycznym i wprowadzana w ruch przez wirujące pola (26)(27)(28). Pomiar prędkości jej wirowania umożliwiają cewki przetwornikowe. Po osiągnięciu przez kulkę określonej prędkości obrotowej (zwykle około 400 obrotów na sekundę) zasilanie energią zostaje wyłączone i następuje wytracanie prędkości spowodowane tarciem gazu. Spadek prędkości obrotowej mierzony jest w funkcji czasu. Ciśnienie pary wyznacza się na podstawie zależnego od ciśnienia spowalniania ruchu kulki stalowej. Zalecany zakres wynosi od 10^{-4} do 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Przyrząd*

Schemat zestawu doświadczalnego pokazano na rysunku 11. Głowicę pomiarową umieszcza się w komorze o stałej temperaturze regulowanej z dokładnością do 0,1 °C. Pojemnik z próbką umieszcza się w oddzielnej komorze, w której temperatura jest również regulowana z dokładnością do 0,1 °C. Wszystkie pozostałe części zestawu są utrzymywane w wyższej temperaturze, aby zapobiec kondensacji. Cały przyrząd połączony jest z układem wysokopróżniowym.

Rysunek 11



A: Głowica pomiarowa wirującego rotora
B: Komórka do pobierania próbek
C: Termostat
D: Przewód próżniowy (pompa turbinowa)
E: Termostat powietrzny

2. **DANE I SPORZĄDZENIE SPRAWOZDANIA**

2.1. DANE

Ciśnienie pary badane dowolną z powyższych metod należy wyznaczyć dla co najmniej dwóch temperatur. Zaleca się przeprowadzenie pomiarów dla trzech lub więcej wartości temperatury w przedziale od 0 do 50 °C, aby sprawdzić liniowość krzywej ciśnienia pary. W przypadku metody efuzji (komórki Knudsena i termograwimetrii izotermicznej) oraz metody nasycania gazu zaleca się zakres temperatury pomiaru w granicach od 120 do 150 °C, zamiast od 0 do 50 °C.

2.2. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

— wskazanie zastosowanej metody,

▼M1

— dokładne określenie substancji (nazwa i zanieczyszczenia) oraz zabieg wstępnego oczyszczania, o ile jest zastosowany,

— co najmniej dwie — a najlepiej trzy lub więcej — wartości ciśnienia pary i temperatury wymagane w przedziale od 0 do 50 °C (lub od 120 do 150 °C),

— co najmniej jedna z wartości temperatury powinna wynosić 25 °C lub poniżej, jeżeli jest to technicznie możliwe zgodnie z wybraną metodą,

— wszystkie dane wyjściowe,

— krzywą zależności log p od 1/T,

— oszacowanie ciśnienia pary w temperaturze 20 lub 25 °C.

Jeśli obserwowana jest przemiana (zmiana stanu, rozkład), to należy podać następujące informacje:

— charakter zmiany,

— temperaturę, w której zachodzi zmiana przy ciśnieniu atmosferycznym,

— ciśnienie pary w temperaturze 10 i 20 °C poniżej temperatury przemiany oraz 10 i 20 °C powyżej tej temperatury (chyba że przemiana zachodzi ze stanu stałego w gazowy).

Należy podać wszystkie informacje i uwagi mające znaczenie dla interpretacji wyników, zwłaszcza w odniesieniu do zanieczyszczeń i fizycznego stanu substancji.

3. **LITERATURA**

(1) *Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich* L 383 A, 26–47 (1992).

(2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., 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 (September 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, 81th 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., Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

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

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

▼M1

Dodatek

Metoda szacowania

WSTĘP

Szacunkowych wartości ciśnienia pary można użyć:

— do ustalenia, która z metod doświadczalnych jest odpowiednia,

— do podania wartości szacunkowej lub granicznej w przypadkach, gdy z powodów technicznych nie można zastosować metody doświadczalnej.

METODA SZACOWANIA

Ciśnienie pary substancji ciekłych i stałych można oszacować przy użyciu zmodyfikowanej korelacji Watsona (a). Jedyną wymaganą daną doświadczalną jest normalna temperatura wrzenia. Metoda ta ma zastosowanie w przedziale ciśnienia od 10^5 Pa do 10^{-5} Pa.

Szczegółowe informacje na temat tej metody podano w publikacji „Handbook of Chemical Property Estimation Methods" (b). Zob. także: OECD Environmental Monograph No. 67 (c).

PROCEDURA OBLICZENIOWA

Ciśnienie pary oblicza się następująco:

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

gdzie:

T = rozpatrywana temperatura,

T_b = normalna temperatura wrzenia,

P_{VP} = ciśnienie pary w temperaturze T,

ΔH_{Vb} = ciepło parowania,

ΔZ_b = współczynnik ściśliwości (oszacowany na 0,97),

m = współczynnik empiryczny zależny od stanu fizycznego w rozpatrywanej temperaturze.

Dalej

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

gdzie K_F jest współczynnikiem empirycznym uwzględniającym polarność substancji. Dla szeregu typów związków współczynniki K_F podano w opracowaniu (b).

▼**M1**

Dość często dostępne są dane, w których podana jest temperatura wrzenia przy obniżonym ciśnieniu. W takim przypadku ciśnienie pary oblicza się następująco:

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

gdzie T_1 jest temperaturą wrzenia przy obniżonym ciśnieniu P_1.

SPRAWOZDANIE

W przypadku użycia metody szacowania sprawozdanie powinno zawierać wyczerpującą dokumentację obliczeń.

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. NAPIĘCIE POWIERZCHNIOWE

1. METODA

Większość opisanych metod oparto na wytycznych OECD dotyczących badań (1). Podstawowe zasady podano w pozycji bibliograficznej (2).

1.1. WPROWADZENIE

Opisywane metody są stosowane do pomiarów napięcia powierzchniowego roztworów wodnych.

Przed przeprowadzeniem tych badań dobrze jest mieć wstępne informacje na temat rozpuszczalności w wodzie, budowy, właściwości hydrolitycznych i stężenia krytycznego dla tworzenia się micelli substancji.

Poniższe metody można stosować w odniesieniu do większości substancji chemicznych, bez jakichkolwiek ograniczeń związanych z ich stopniem czystości.

Pomiar napięcia powierzchniowego metodą tensjometru pierścieniowego jest zastrzeżony wyłącznie dla roztworów wodnych o lepkości dynamicznej mniejszej niż około 200 mPa s.

1.2. DEFINICJE IJEDNOSTKI

Jako napięcie powierzchniowe określa się entalpię wolnej powierzchni na jednostkę pola powierzchni.

Napięcie powierzchniowe jest podawane jako:

N/rn (układ SI) lub

mN/m (układ SI)

1 N/m = 103 dyn/cm

1 mN/m = 1 dyna/cm w nieważnym systemie CGS

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

Substancje odniesienia, które obejmują szeroki zakres napięć powierzchniowych, podano w pozycjach bibliograficznych (1) i (3).

1.4. ZASADA METOD

Metody te opierają się na pomiarach maksymalnej siły, jaką trzeba wywierać pionowo na mieszadło lub pierścień w kontakcie z powierzchnią badanej cieczy umieszczonej naczyniu miarowym, aby oddzielić ją od tej powierzchni, bądź też na płytkę, której krawędź wchodzi w kontakt z powierzchnią, aby pociągnąć do góry utworzoną błonkę.

Substancje o rozpuszczalności w wodzie przynajmniej w stężeniu 1 mg/l badane są w roztworach wodnych w pojedynczych stężeniach.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Metody te zapewniają większą precyzję niż wymagana na ogół do ocen przy przeglądach środowiskowych.

▼B

1.6. OPIS METOD

Roztwór substancji przygotowuje się w wodzie destylowanej. Stężenie tego roztworu powinno wynosić 90 % rozpuszczalności nasycenia w wodzie, jeżeli to stężenie przekracza 1 g/l, do badania stosuje się stężenie 1 g/l. Nie podlegają badaniu substancje, których rozpuszczalność w wodzie jest mniejsza niż 1 mg/l.

1.6.1. **Metoda płytkowa**

Zob. ISO 304 i NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2. **Metoda zawieszki**

Zob. ISO 304 and NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3. **Metoda pierścieniowa**

Zob. ISO 304 and NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4. **Zharmonizowana metoda pierścieniowa OECD**

1.6.4.1. *Przyrząd*

Do tego pomiaru można wykorzystać dostępne w handlu tensjometry. Składają się one z następujących elementów:

— ruchomy stół próbki,

— system pomiaru siły,

— ciało pomiarowe (pierścień),

— naczynie pomiarowe.

1.6.4.1.1. Ruchomy stół próbki

Ruchomy stół z próbką jest wykorzystywany jako wspornik dla naczynia pomiarowego z kontrolowaną temperaturą, w którym znajduje się badana ciecz. Razem z układem do pomiaru siły stół ten jest montowany na stojaku.

1.6.4.1.2. System pomiaru siły

Układ do pomiaru siły (zob. rysunek) mieści się ponad stołem z próbką. Błąd pomiaru siły nie może przekraczać ± 10^{-6} N, co odpowiada granicy błędu wynoszącej ± 0,1 mg w przypadku pomiaru masy. W większości przypadków skalę pomiarową dostępnych na rynku tensjometrów kalibruje się w mN/m, tak aby napięcie powierzchniowe można było odczytywać bezpośrednio w mN/m, z dokładnością do 0,1 mN/m.

▼B

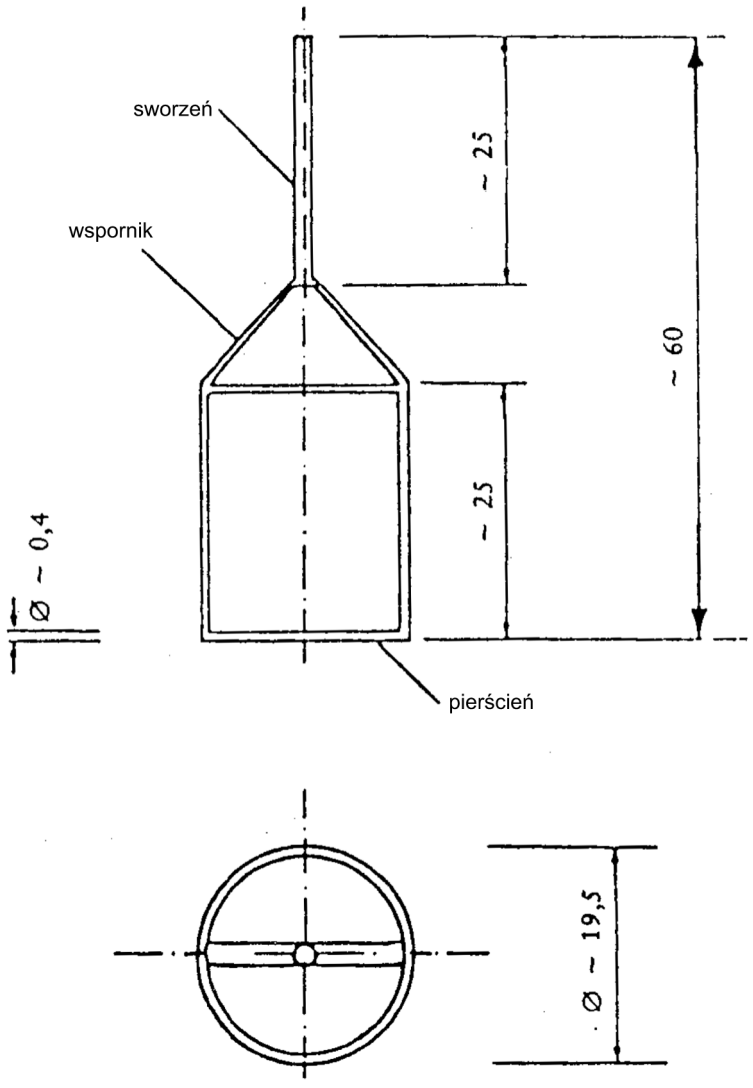
1.6.4.1.3. Ciało pomiarowe (pierścień)

Pierścień na ogół jest wykonany z drutu platynowo-irydowego o grubości około 0,4 mm i średnim obwodzie 60 mm. Pierścień drutu zwiesza się horyzontalnie z metalowego sworznia i drucianego wspornika, tak aby stworzyć połączenie z układem do pomiaru siły (zob. rysunek).

Rysunek

Ciało pomiarowe

(Wszystkie wymiary w milimetrach)



1.6.4.1.4. Naczynie pomiarowe

Naczynie pomiarowe z badanym roztworem musi być naczyniem szklanym z kontrolowaną temperaturą. Musi być tak zaprojektowane, aby w trakcie pomiaru temperatura roztworu badanego i fazy gazowej nad jego powierzchnią pozostały stałe, a próbka nie mogła wyparować. Dopuszczalne są cylindryczne, szklane naczynia o średnicy wewnętrznej nie mniejszej niż 45 mm.

▼B

1.6.4.2. *Przygotowanie przyrządu*

1.6.4.2.1. C z y s z c z e n i e

Szklane naczynia muszą być starannie oczyszczone. W razie potrzeby należy je przepłukać gorącym kwasem chromowo-siarkowym, a następnie kwasem fosforowym o konsystencji syropu (od 83 do 98 % wagowo H_3PO_4), potem starannie przepłukać pod wodą z kranu, a wreszcie umyć dwukrotnie destylowaną wodą do uzyskania reakcji obojętnej, a na końcu wysuszyć lub przepłukać częścią płynnej próbki mierzonej.

Pierścień należy najpierw starannie opłukać w wodzie w celu usunięcia wszelkich substancji rozpuszczalnych w tej cieczy, następnie na krótki czas zanurzyć w kwasie chromowo-siarkowym, później umyć dwukrotnie destylowaną wodą do uzyskania reakcji obojętnej, a na końcu krótko podgrzać nad płomieniem metanolowym.

Uwaga:

Zanieczyszczenia substancjami, które nie ulegają rozpuszczeniu ani zniszczeniu wskutek oddziaływania kwasu chromo-siarkowego lub fosforowego, takimi jak silikony, należy usunąć przy pomocy odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego.

1.6.4.2.2. K a l i b r a c j a p r z y r z ą d u

Weryfikacja przyrządu polega na sprawdzeniu punktu zerowego i takim jego wyregulowaniu, aby wskazania instrumentu pozwalały na niezawodne oznaczenia w mN/m.

Montaż:

Przyrząd musi być wypoziomowany, na przykład przy pomocy poziomnicy alkoholowej, u podstawy tensjometru, przez wyregulowanie śrub poziomujących u podstawy.

Ustawienie punktu zero:

Po zamontowaniu pierścienia na przyrządzie, przed jego zanurzeniem w cieczy, wskazania tensjometru należy wyregulować do zera i sprawdzić, czy pierścień jest ustawiony równolegle do powierzchni cieczy. W tym celu powierzchnię cieczy można wykorzystać jako lustro.

Kalibracje:

Kalibrację przy pomocy rzeczywistego badania można dokonać przy pomocy jednej z dwóch procedur:

a) używając masę: procedura wykorzystująca koniki wagi o znanej masie od 0,1 do 1,0 g umieszczane na pierścieniu. Współczynnik kalibracyjny Φ_a, przez który należy pomnożyć wszystkie wskazania instrumentu, należy ustalić według następującego wzoru (1):

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

gdzie:

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

m = masa konika wagi (g),

g = przyspieszenie grawitacyjne (981 cm/sek^{-2} na wysokości poziomu morza),

b = średni obwód pierścienia (cm),

σ_a = odczyt tensjometru po umieszczeniu konika na pierścieniu (mN/m);

▼B

b) używając wodę: procedura stosująca czystą wodę, której napięcie powierzchniowe przy na przykład 23 °C jest równe 72,3 mN/m. Niniejsza procedura jest wykonywana szybciej niż kalibracja wagowa, lecz występuje przy niej zawsze niebezpieczeństwo, że napięcie powierzchniowe wody jest zafałszowane śladowymi zanieczyszczeniami związków powierzchniowo czynnych.

Współczynnik kalibracyjny Φ_b, przez który należy pomnożyć wszystkie wskazania instrumentu, należy ustalić według następującego wzoru (2):

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

gdzie:

σ_o = cytowana w literaturze wartość napięcia powierzchniowego wody (mN/m),

σ_g = zmierzona wartość napięcia powierzchniowego wody (mN/m), obie w tej samej temperaturze.

1.6.4.3. *Przygotowanie próbek*

Należy sporządzić roztwory wodne badanych substancji, używając odpowiednich stężeń w wodzie. Nie mogą one zawierać substancji w stanie nierozpuszczonym.

Roztwór należy utrzymywać w stałej temperaturze (± 0,5°C). Ponieważ napięcie powierzchniowe roztworu w naczyniu pomiarowym zmienia się w czasie, należy wykonać kilka pomiarów w różnych momentach i nakreślić krzywą pokazującą napięcie powierzchniowe w funkcji czasu. Brak jakichkolwiek dalszych zmian oznacza, że osiągnięto stan równowagi.

Zanieczyszczenie pyłami i gazami innych substancji przeszkadza w pomiarze. Dlatego badanie musi być prowadzone pod przykrywą ochronną.

1.6.5. **Warunki badania**

Pomiar należy przeprowadzić w temperaturze około 20 °C, która musi być kontrolowana w ten sposób, aby utrzymywała się w zakresie ± 0,5°C.

1.6.6. **Wykonanie badania**

Roztwory do pomiaru należy wprowadzić do starannie wyczyszczonego naczynia pomiarowego, dokładając wszelkich starań, aby uniknąć wytwarzania piany, a następnie naczynie umieszcza się na stoliku przyrządu do badań. Blat stolika z naczyniem pomiarowym należy unieść do momentu zanurzenia pierścienia poniżej powierzchni roztworu badanego. Następnie blat stolika opuszcza się stopniowo i równo (z szybkością około 0,5 cm/min), tak aby oddzielić pierścień od powierzchni, do momentu osiągnięcia maksymalnej siły. Warstwa cieczy dołączona do pierścienia nie może się od niego oddzielić. Po wykonaniu pomiarów pierścień należy ponownie zanurzyć poniżej powierzchni i powtórzyć pomiary, aż zostanie osiągnięta stała wartość napięcia powierzchniowego. W przypadku każdego oznaczenia należy zapisać czas odprzeniesienia roztworu do naczynia pomiarowego. Odczyty należy wykonywać przy maksymalnej sile potrzebnej do oderwania pierścienia od powierzchni cieczy.

▼B

2. **DANE**

W celu obliczenia napięcia powierzchniowego wartość odczytaną w mN/m na przyrządzie należy na początku pomnożyć przez współczynnik kalibracyjny Φ_a lub Φ_b (zależnie od zastosowanej procedury kalibracyjnej). Da to wartość jedynie przybliżoną, dlatego wymaga korekcji.

Harkins i Jordan (4) empirycznie ustalili współczynniki korekcji dla wartości napięcia powierzchniowego zmierzonych metodą pierścienia. Zależą one od wymiarów pierścienia, gęstości cieczy i napięcia powierzchniowego tej ostatniej.

Ponieważ ustalanie współczynnika korekcji dla każdego kolejnego pomiaru na podstawie tabel Harkinsa i Jordana jest pracochłonne, do obliczenia napięcia powierzchniowego roztworów wodnych można wykorzystać procedurę uproszczoną wykonywania odczytów skorygowanych wartości napięcia powierzchniowego bezpośrednio z tabeli. (W przypadku gdy odczytane wartości znajdują się między tymi, które podano w tabeli, należy zastosować interpolację).

Tabela

Korekcja zmierzonego napięcia powierzchniowego

Tylko dla roztworów wodnych, $\rho \cong 1\ g/cm^3$

r	= 9,55 mm (średni promień pierścienia)
r	= 0,185 mm (promień drutu pierścienia)

Wartość doświadczalna (mN/m)	Wartość skorygowana (mN/m)	
	Kalibracja wagowa (zob. 1.6.4.2.2 lit. a))	Kalibracja wodą (zob. 1.6.4.2.2 lit.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

Wartość doświadczalna (mN/m)	Wartość skorygowana (mN/m)	
	Kalibracja wagowa (zob. 1.6.4.2.2 lit. a))	Kalibracja wodą (zob. 1.6.4.2.2 lit.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	—

Niniejsza tabela została zestawiona na podstawie poprawki Harkinsa-Jordana. Jest ona zbliżona do tej w normie (DIN 53914) dla wody i roztworów wodnych (gęstość $\rho = 1\ g/cm^3$) i dla dostępnych w handlu pierścieni o wymiarach R = 9,55 mm (średni promień pierścienia) i r = 0,185 mm (promień drutu pierścienia). W tabeli podano skorygowane wartości pomiarów napięcia powierzchniowego wykonanych po kalibracji odważnikowej lub przy pomocy wody.

Alternatywnie, bez poprzednio opisanej kalibracji, napięcie powierzchniowe można obliczyć na podstawie następującego wzoru:

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

gdzie:

F = siła zmierzona dynamometrem przy zerwaniu błonki,

R = promień pierścienia,

f = współczynnik korekcji (1).

3. **SPORZĄDZENIE SPRAWOZDANIA**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— zastosowana metoda,

— rodzaj zastosowanej wody lub zastosowanego roztworu,

— precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),

— wyniki pomiaru: napięcie powierzchniowe (odczyt), z podaniem zarówno poszczególnych odczytów, jak i ich średniej arytmetycznej oraz skorygowanej średniej (z wzięciem pod uwagę współczynnika przyrządu i tabeli korekcji),

▼B

— stężenie roztworu,

— temperatura badania,

— wiek zastosowanego roztworu; w szczególności czas od przygotowania do zmierzenia właściwości roztworu,

— opis zależności napięcia powierzchniowego od czasu po przeniesieniu roztworu do naczynia pomiarowego,

— należy podać wszystkie informacje i uwagi istotne dla interpretacji wyników, w szczególności w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu skupienia substancji.

3.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Zważywszy że destylowana woda posiada napięcie powierzchniowe 72,75 mN/m w 20 °C, substancje wykazujące napięcie powierzchniowe niższe niż 60 mN/m zgodnie z warunkami niniejszej metody należy uznać za materiały będące powierzchniowo czynnymi.

4. **LITERATURA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, 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, 511.

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

▼M4

A.6. ROZPUSZCZALNOŚĆ W WODZIE

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 105 (OECD TG 105) (1995). Niniejsza metoda badawcza stanowi zmienioną wersję pierwotnej metody opisanej w OECD TG 105, przyjętej w 1981 r. Pomiędzy aktualną wersją a wersją z 1981 r. nie ma zasadniczych różnic. Zmiany dotyczyły przede wszystkim formatu. Przegląd był oparty o metodę badawczą UE „Water solubility" (Rozpuszczalność w wodzie) ([1]).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

2. Na rozpuszczalność substancji w wodzie w sposób istotny może wpłynąć obecność zanieczyszczeń. Niniejsza metoda badawcza dotyczy oznaczania rozpuszczalności w wodzie substancji zasadniczo czystych, które w wodzie są stabilne i nie mają charakteru lotnego. Przed oznaczeniem rozpuszczalności w wodzie przydatne jest posiadanie pewnych wstępnych informacji na temat substancji badanej, takich jak wzór strukturalny, ciśnienie pary, stała dysocjacji i hydroliza jako funkcja pH.

3. W niniejszym opisie metody badawczej podano dwie metody: metodę wymywania, służącą do oznaczania rozpuszczalności niższej niż 10^{-2} g/l, i metodę wytrząsania w kolbie, służącą do wyznaczania rozpuszczalności wyższej. Opisano również proste badanie wstępne. Umożliwia ono wyznaczenie w przybliżeniu odpowiedniej ilości próbki, jaka ma być użyta w ostatecznym badaniu, jak również czasu niezbędnego do uzyskania roztworu nasyconego.

DEFINICJE I JEDNOSTKI

4. Rozpuszczalność substancji w wodzie jest to stężenie masowe substancji w nasyconym roztworze wodnym w określonej temperaturze.

5. Rozpuszczalność w wodzie wyraża się jako masę substancji rozpuszczonej na objętość roztworu. Jednostką w układzie SI jest kg/m^3, można również stosować jednostkę g/l.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

6. Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia przy określaniu rozpuszczalności substancji badanej.

OPIS METOD

Warunki badania

7. Najkorzystniej jest przeprowadzić badanie w temperaturze 20 ± 0,5 °C. Wybrana temperatura powinna być utrzymywana na stałym poziomie we wszystkich istotnych częściach sprzętu.

Badanie wstępne

8. Stosowana jest procedura sekwencyjna. Do ok. 0,1 g próbki (substancje stałe należy sproszkować) znajdującej się w cylindrze miarowym o pojemności 10 ml, zamkniętym korkiem szklanym, dodaje się w temperaturze pokojowej kolejne jednostki objętości wody. Po każdym dodaniu jednostki wody mieszaninę wstrząsa się przez 10 minut i kontroluje wzrokowo pod kątem jakichkolwiek nierozpuszczonych części próbki. Jeżeli po dodaniu 10 ml wody próbka lub jej część pozostają nierozpuszczone, doświadczenie kontynuuje się przy użyciu cylindra miarowego o objętości 100 ml. Przybliżoną rozpuszczalność podano w tabeli 1 poniżej pod taką objętością wody, w jakiej dochodzi do pełnego rozpuszczenia próbki. Jeżeli rozpuszczalność

▼M4

jest mała, do rozpuszczenia substancji badanej może być potrzebne dużo czasu i należy ją pozostawić na co najmniej 24 godziny. Jeżeli po 24 godzinach substancja badana pozostaje nierozpuszczona, należy ją pozostawić na dłużej (do 96 godzin) lub poczynić próbę dalszego rozcieńczenia w celu stwierdzenia, czy należy zastosować metodę wymywania, czy metodę wytrząsania w kolbie.

Tabela 1

ml wody na 0,1 g substancji rozpuszczalnej	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Przybliżona rozpuszczalność w g/l	> 1 000	1 000–200	200–100	100–50	50–10	10–1	< 1

Metoda wymywania

Zasady ogólne

9. Niniejsza metoda jest oparta na wymywaniu wodą substancji badanej z mikrokolumny wypełnionej obojętnym nośnikiem pokrytym uprzednio nadmiarem badanej substancji (2). Rozpuszczalność w wodzie podawana jest jako stężenie masowe eluatu po osiągnięciu wartości plateau w funkcji czasu.

Przyrząd

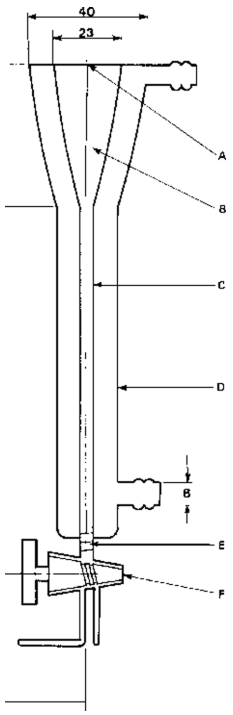
10. Przyrząd składa się z mikrokolumny (rysunek 1) utrzymywanej w stałej temperaturze. Połączona jest ona z pompą recyrkulacyjną (rysunek 2) lub z naczyniem poziomującym (rysunek 3). Mikrokolumna zawiera obojętny nośnik utrzymywany na miejscu małą zatyczką z waty szklanej, która służy także do odfiltrowywania cząstek. Jako nośnik można zastosować szklane kulki, ziemię okrzemkową lub inny obojętny materiał.

11. Mikrokolumna przedstawiona na rysunku 1 nadaje się do zestawu z pompą recyrkulacyjną. W górnej części kolumny znajduje się przestrzeń mieszcząca pięć objętości złoża (ilość usuwaną na początku doświadczenia) i pięć próbek (pobieranych do analizy podczas doświadczenia). Alternatywnie jej rozmiar może być zmniejszony, jeżeli do układu można dodawać wody podczas doświadczenia w celu zastąpienia pięciu objętości złoża usuniętych wraz z zanieczyszczeniami. Kolumna jest połączona rurką z obojętnego materiału z pompą recyrkulacyjną o wydajności około 25 ml/godz. Pompa recyrkulacyjna może być na przykład pompą perystaltyczną lub membranową. Należy uważać, aby nie doszło do zanieczyszczenia lub adsorpcji na materiale rurki.

12. Schematyczny układ obejmujący naczynie poziomujące przedstawiono na rysunku 3. W tym przypadku mikrokolumna wyposażona jest w zawór jednostronnie odcinający. Podłączenie do naczynia poziomującego składa się ze szlifowanego złącza szklanego i rurki z obojętnego materiału. Prędkość wypływu z naczynia poziomującego powinna wynosić w przybliżeniu 25 ml/godz.

▼**M4**

Rysunek 1



Wymiary w mm

A. Połączenie szlifowanego złącza szklanego

B. Przestrzeń nadpowierzchniowa

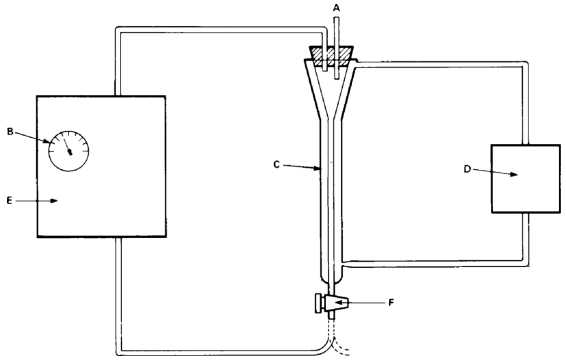
C. Wewnętrz 5

D. Zewnętrz 19

E. Zatyczka z waty szklanej

F. Zawór odcinający

Rysunek 2



A. Wyrównywanie ciśnienia do atmosferycznego

B. Przepływomierz

C. Mikrokolumna

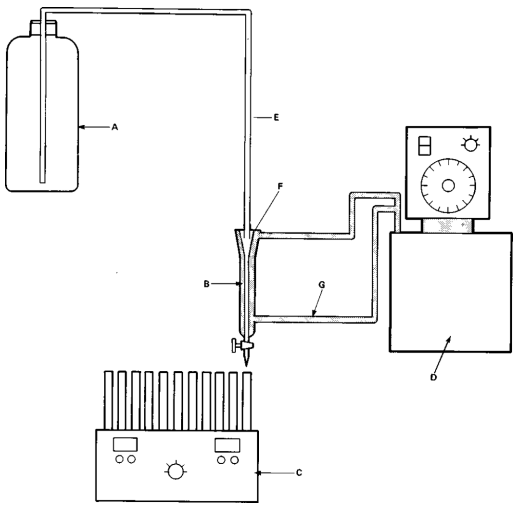
D. Pompa cyrkulacyjna kontrolowana termostatycznie

E. Pompa recyrkulacyjna

F. Zawór dwudrożny do próbkowania

▼**M4**

Rysunek 3



A. Naczynie poziomujące (np. 2,5-litrowa kolba)

B. Kolumna

C. Odbiornik frakcji

D. Termostat

E. Rurka teflonowa

F. Szlifowane złącze szklane

G. Linia wodna (pomiędzy termostatem i kolumną, średnica wewnętrzna około 8 mm)

13. Około 600 mg materiału nośnika przenieść do kolby okrągłodennej o pojemności 50 ml. Stosowną ilość substancji badanej rozpuścić w lotnym rozpuszczalniku o czystości analitycznej i dodać odpowiednią ilość tego roztworu do nośnika. Rozpuszczalnik poddać całkowitemu odparowaniu, np. w wyparce obrotowej, ponieważ w innym razie nośnik nie zostanie całkowicie nasycony wodą podczas etapu wymywania z powodu podziału faz na powierzchni nośnika. Upakowany nośnik pozostawić do nasączenia na dwie godziny w około 5 ml wody, a następnie zawiesinę wlać do mikrokolumny. Alternatywnie można wsypać suchy, upakowany nośnik do mikrokolumny wypełnionej wodą i pozostawić na dwie godziny do ustalenia stanu równowagi.

14. Upakowanie nośnika może stwarzać problemy prowadzące do błędnych wyników, np. jeżeli substancja badana osadza się jako olej. Problemy te należy zbadać, a szczegóły zamieścić w sprawozdaniu.

Procedura z zastosowaniem pompy recyrkulacyjnej

15. Uruchomić przepływ przez kolumnę. Zalecane jest stosowanie szybkości przepływu około 25 ml/godz. – odpowiada to 10 objętościom złoża na godzinę dla opisanej tu kolumny. Odrzucić co najmniej pięć pierwszych wypełnień złoża w celu usunięcia rozpuszczalnych w wodzie zanieczyszczeń. Następnie uruchomić pompę aż do uzyskania równowagi, definiowanej poprzez wyniki pomiarów dla pięciu kolejnych próbek, w których stężenie nie różni się o więcej niż ± 30 % przy losowym rozkładzie różnic. Próbki te powinny zostać od siebie oddzielone w odstępach czasowych odpowiadających przejściu eluentu w ilości co najmniej dziesięciokrotnej objętości złoża. W zależności od zastosowanej metody analitycznej lepszą metodą może być wykreślenie krzywej zależności stężenia od czasu w celu wykazania osiągnięcia stanu równowagi.

▼M4

Procedura z zastosowaniem naczynia poziomującego

16. Zebrać kolejne frakcje eluatu i wykonać analizę wybraną metodą. Do oznaczenia rozpuszczalności wykorzystuje się frakcje ze środkowego zakresu eluatu, gdzie stężenia są stałe w granicach ± 30 % w co najmniej pięciu kolejnych frakcjach.

17. Preferowanym eluentem jest woda podwójnie destylowana. Można również użyć wody zdejonizowanej o rezystywności powyżej 10 MΩ/cm i całkowitej zawartości węgla organicznego poniżej 0,01 %.

18. W obu procedurach wykonuje się drugą serię pomiarów przy połowie prędkości przepływu zastosowanej w pierwszej serii. Jeżeli wyniki obu serii są zgodne, badanie należy uznać za zadowalające. Jeżeli zmierzona rozpuszczalność przy niższej prędkości przepływu jest większa, wtedy należy powtarzać procedurę zmniejszania tej prędkości o połowę tak długo, dopóki w dwóch kolejnych seriach nie uzyska się takiej samej rozpuszczalności.

19. W obu procedurach należy kontrolować frakcje pod kątem obecności zawiesin koloidalnych przez sprawdzenie, czy nie występuje efekt Tyndalla. Obecność takich cząstek powoduje nieważność badania i po poprawieniu działania filtrującego kolumny należy je powtórzyć.

20. Należy zmierzyć pH każdej próbki, najlepiej przy użyciu specjalnych pasków wskaźnikowych.

Metoda wytrząsania w kolbie

Zasady ogólne

21. Substancję badaną (ciała stałe muszą zostać sproszkowane) rozpuścić w wodzie w temperaturze nieco wyższej od temperatury badania. Po uzyskaniu nasycenia mieszaninę schłodzić i utrzymywać w temperaturze badania. Alternatywnie, jeżeli za pomocą właściwego pobierania próbek upewniono się co do osiągnięcia stanu równowagi nasycenia, pomiar może być wykonywany bezpośrednio w temperaturze badania. Następnie przy pomocy odpowiedniej metody analitycznej oznaczyć stężenie masowe substancji badanej w roztworze wodnym, który nie może zawierać żadnych nierozpuszczonych cząstek (3).

Przyrząd

22. Potrzebne są następujące materiały:

— zwykłe szkło laboratoryjne i instrumenty,

— urządzenie służące do mieszania roztworów w kontrolowanej, stałej temperaturze,

— o ile jest potrzebna w przypadku emulsji – wirówka (najlepiej z termostatem), oraz

— sprzęt do wykonywania analiz.

Procedura

23. Na podstawie badania wstępnego oszacować ilość substancji badanej niezbędną do nasycenia pożądanej objętości wody. Odważyć około pięciokrotność tej ilości do każdego z trzech naczyń szklanych wyposażonych w korki szklane (np. probówek wirówkowych, kolb). Do każdego naczynia dodać pewną objętość wody zależną od wybranej metody analitycznej i zakresu rozpuszczalności. Następnie mocno zatkane korkiem naczynia wytrząsać w temperaturze 30 °C. Należy użyć wytrząsarki lub mieszarki, która może działać w stałej temperaturze, np. mieszadła magnetycznego w łaźni wodnej z temperaturą kontrolowaną termostatem. Po jednym dniu jedno z naczyń pozostawić do ustalenia stanu równowagi na 24 godziny w temperaturze badania, przy czym od czasu do czasu należy je wstrząsnąć. Zawartość naczynia poddać następnie wirowaniu w temperaturze badania i oznaczyć stężenie substancji badanej w klarownej fazie wodnej za pomocą

▼M4

odpowiedniej metody analitycznej. Z pozostałymi dwiema kolbami postąpić podobnie po początkowym ustaleniu stanu równowagi w temperaturze 30 °C przez, odpowiednio, dwa i trzy dni. Jeżeli wyniki oznaczenia stężenia w co najmniej dwóch ostatnich naczyniach nie różnią się o więcej niż 15 %, badanie należy uznać za zadowalające. Jeżeli wyniki dla naczyń 1, 2 i 3 wykazują tendencję do wzrastających wartości, całe badanie należy powtórzyć, stosując dłuższe okresy ustalania równowagi.

24. Badanie można również wykonać bez wstępnej inkubacji w 30 °C. W celu oceny szybkości ustalania się równowagi nasycenia próbki pobiera się do momentu, gdy czas mieszania nie wywiera już wpływu na mierzone stężenie.

25. Należy zmierzyć pH każdej próbki, najlepiej przy użyciu specjalnych pasków wskaźnikowych.

Oznaczenia analityczne

26. Najkorzystniejsza jest metoda specyficzna dla substancji, gdyż małe ilości rozpuszczalnych zanieczyszczeń mogą spowodować duże błędy wyników pomiarów rozpuszczalności. Przykładami takich metod są: chromatografia gazowa lub cieczowa, miareczkowanie, fotometria, woltamperometria.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

Metoda wymywania

27. W każdej serii należy obliczyć wartość średnią i odchylenie standardowe dla co najmniej pięciu kolejnych próbek pobranych przy plateau nasycenia. Wartości średnie uzyskane w dwóch badaniach przy różnych prędkościach przepływu nie powinny się różnić o więcej niż 30 %.

Metoda wytrząsania w kolbie

28. Wyniki pomiarów dla każdej z trzech kolb, które nie powinny się różnić o więcej niż 15 %, uśrednia się.

Sprawozdanie z badania

Metoda wymywania

29. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

— wyniki badania wstępnego,

— nazwa chemiczna i informacje o zanieczyszczeniach (oczyszczanie wstępne, jeżeli zostało przeprowadzone),

— stężenia, prędkości przepływu i pH dla każdej próbki,

— średnie i odchylenia standardowe dla co najmniej pięciu próbek przy plateau nasycenia dla każdej serii,

— średnia z co najmniej dwóch kolejnych serii,

— temperatura wody w czasie procesu nasycania,

— metoda analityczna,

— charakter nośnika,

— upakowanie nośnika,

— zastosowany rozpuszczalnik,

— dowody niestabilności chemicznej substancji w trakcie badania,

— wszystkie informacje istotne dla interpretacji wyników, szczególnie w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu fizycznego substancji badanej.

▼**M4**

Metoda wytrząsania w kolbie

30. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

— wyniki badania wstępnego,

— nazwa chemiczna i informacje o zanieczyszczeniach (oczyszczanie wstępne, jeżeli zostało przeprowadzone),

— poszczególne oznaczenia analityczne, a w przypadku gdy dla każdej kolby była oznaczana więcej niż jedna wartość, ich średnia,

— pH każdej próbki,

— średnia wartości dla różnych kolb, które były zgodne,

— temperatura badania,

— metoda analityczna,

— dowody na jakąkolwiek niestabilność chemiczną substancji w trakcie badania,

— wszystkie informacje istotne dla interpretacji wyników, szczególnie w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu fizycznego substancji badanej.

BIBLIOGRAFIA:

(1) Dyrektywa Komisji 92/69/EWG z dnia 31 lipca 1992 r. dostosowująca po raz siedemnasty do postępu technicznego dyrektywę 67/548/EWG w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji i etykietowania substancji niebezpiecznych (Dz.U. L 383 z 29.12.1992, s. 113).

(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. WSPÓŁCZYNNIK PODZIAŁU

1. METODA

Opisana metoda „wstrząsania kolby” jest oparta na wytycznych OECD dotyczących badań (1).

1.1. WPROWADZENIE

Dla wykonania niniejszego badania korzystne jest posiadanie informacji wstępnych dotyczących wzoru strukturalnego, stałej dysocjacji, rozpuszczalności w wodzie, hydrolizy, rozpuszczalności w n-oktanolu i napięcia powierzchniowego substancji.

Pomiary na substancjach ulegających jonizacji powinny być wykonane tylko na ich niezjonizowanej postaci (wolny kwas lub wolna zasada) uzyskanej przez użycie właściwego buforu o pH co najmniej jedną jednostkę mniejszą (wolny kwas) lub większą (wolna zasada) od pK.

Niniejsza metoda badania zawiera dwie oddzielne procedury: metoda wstrząsania kolby i chromatografii cieczowej wysokiej wydajności (HPLC). Pierwszą stosuje się gdy wartość log P_{ow} (zob. definicje poniżej) wypada w zakresie od - 2 do 4, drugą w zakresie od 0 do 6. Przed przeprowadzeniem procedury doświadczalnej, należy wpierw wstępnie uzyskać oszacowanie współczynnika podziału.

Metodę wstrząsania kolby stosuje się jedynie do zasadniczo czystych substancji rozpuszczalnych w wodzie i n-oktanolu. Nie stosuje się jej do materiałów powierzchniowo czynnych (dla takich należy podać wartość obliczoną lub oszacowaną opartą na rozpuszczalności danej substancji w n-oktanolu i w wodzie).

Metody HPLC nie stosuje się dla silnych kwasów i zasad, związków kompleksowych metali, materiałów powierzchniowo czynnych lub substancji, które reagują z rozpuszczalnikiem wymywającym. Dla takich materiałów należy podać wartość obliczoną lub oszacowaną opartą na rozpuszczalności danej substancji w n-oktanolu i w wodzie.

Metoda HPLC jest mniej czuła na obecność zanieczyszczeń w badanym związku niż metoda wstrząsania kolby. Pomimo tego, zanieczyszczenia w niektórych przypadkach mogą czynić interpretację wyników trudną, ponieważ wyznaczenie piku jest niepewne. Dla mieszanin dających nieczytelne pasmo, należy ustalić górną i dolną granicę log P.

1.2. DEFINICJA I JEDNOSTKI

Współczynnik podziału (P) definiuje się jako stosunek stężeń równowagi (c_i) substancji rozpuszczonej w układzie dwufazowym, składającym się z dwóch zasadniczo niemieszających się ze sobą rozpuszczalników. W przypadku n-oktanolu i wody:

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

Dlatego współczynnik podziału (P) jest ilorazem dwóch stężeń, przy czym na ogół podaje się go w postaci jego logarytmu o podstawie 10 (log P).

▼B

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Metoda wstrząsania kolby

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

Metoda HPLC

W celu skorelowania danych zmierzonych metodą HPLC danego związku z jego wartością P należy ustalić krzywą kalibracji log P w zależności od danych chromatograficznych, używając co najmniej 6 punktów odniesienia. Jest zadaniem użytkownika wybór właściwych substancji odniesienia. W każdym przypadku, gdy będzie możliwe, co najmniej jedna substancja odniesienia powinna posiadać P_{ow} powyżej tego dla substancji badanej, a druga powinna posiadać P_{ow} poniżej substancji badanej. Dla wartości log P mniejszej niż 4 kalibracja musi być oparta o dane uzyskane metodą wstrząsania kolby. Dla wartości log P większej od 4 kalibracja powinna być oparta na ważnych wartościach literaturowych, jeżeli są one zgodne z wartościami wyliczonymi. Celem uzyskania lepszej dokładności, zalecane jest wybór takich substancji odniesienia, które są strukturalnie zbliżone do badanej substancji.

Rozszerzone wykazu wartości log P_{ow} dla wielu grup związków chemicznych są dostępne w pozycjach bibliograficznych (2) i (3). Jeżeli dane współczynnika podziału strukturalnie zbliżonych związków nie są dostępne, należy zastosować bardziej ogólną kalibrację, ustaloną w oparciu o inne związki odniesienia.

Wykaz zalecanych substancji odniesienia i ich wartości P_{ow} podano w dodatku 2.

1.4. ZASADA METODY

1.4.1. **Metoda wstrząsania kolby**

W celu ustalenia współczynnika podziału należy uzyskać równowagę między wszystkimi wchodzącymi w interakcje składnikami układu, przy czym należy ustalić stężenie substancji rozpuszczonych w dwóch fazach. Studia w zakresie literatury na ten temat wskazują, że możliwe jest użycie kilku różnych technik dla rozwiązania niniejszego problemu, to jest poprzez zmieszanie dwóch faz oraz kolejno ich rozdzielenie w celu ustalenia stężenia równowagi badanej substancji.

1.4.2. **Metoda HPLC**

HPLC jest wykonywana na kolumnach analitycznych wypełnionych handlowo dostępną fazą stałą zawierającą długo łańcuchowe węglowodory (np. C_8, C_{18}) chemicznie związane na krzemionce. Związki chemiczne wstrzyknięte do takiej kolumny przesuwają się w niej z różnymi szybkościami z powodu różnych stopni ich podziału między fazą ruchomą oraz węglowodorową fazą stacjonarną. Mieszaniny związków chemicznych są wymywane w kolejności ich hydrofobowości, pierwsze wymywane są związki chemiczne rozpuszczalne w wodzie, a na końcu związki chemiczne rozpuszczalne w olejach, proporcjonalnie do ich współczynnika podziału między węglowodory oraz wodę. Umożliwia to uzyskanie zależności między czasem retencji na takiej kolumnie (odwrócona faza) i ustalenie współczynnika podziału n-oktanol/woda. Współczynnik podziału jest wyprowadzany ze współczynnika objętości k, podanego wyrażeniem:

▼B

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

w której t_r = czas retencji badanej substancji, t_o = średni czas przejścia cząsteczek rozpuszczalnika przez kolumnę (czas martwy).

Nie są wymagane analizy ilościowe, a konieczne jest tylko oznaczenie czasu wymywania.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

1.5.1. **Powtarzalnoś**

Metoda wstrząsania kolby

W celu zapewnienia precyzji współczynnika podziału należy przeprowadzić dwukrotne oznaczenia w trzech różnych warunkach badania, przy czym można zmieniać ilość oznaczanej substancji oraz stosunek objętości rozpuszczalników. Ustalone wartości współczynnika podziału wyrażone jako ich wspólne logarytmy powinny zawierać się w przedziale ± 0,3 jednostek logarytmicznych.

Metoda HPLC

W celu zwiększenia poziomu ufności pomiaru, należy wykonać podwójne oznaczenia. Wartości log P wyprowadzone z poszczególnych pomiarów powinny mieścić się w zakresie ± 0,1 jednostek logarytmicznych.

1.5.2. **Czułość**

Metoda wstrząsania kolby

Zakres pomiarowy metody ustala się na podstawie granicy wykrywalności procedury analitycznej. Powinno to pozwalać na ocenę wartości log P_{ow} w zakresie od - 2 do 4 (wyjątkowo, gdy zezwalają warunki, niniejszy zakres może być rozszerzony do log P_{ow} do 5), gdy stężenie rozpuszczenia w jednej z faz jest nie większe niż 0,01 mola na litr.

Metoda HPLC

Metoda HPLC umożliwia ocenę współczynnika podziału w zakresie log P_{ow} od 0 do 6.

Zwykle współczynnik podziału danego związku może być oszacowany z dokładnością w obrębie zakresu ± 1 jednostki logarytmicznej wartości uzyskanej z metody wstrząsania kolby. Typowe korelacje można znaleźć w pozycjach bibliograficznych (4), (5), (6), (7) i (8). Wyższą dokładność można zwykle uzyskać, gdy krzywe korelacji są oparte na strukturalnie zbliżonych związkach odniesienia (9).

▼B

1.5.3. **Specyficznoś**

Metoda wstrząsania kolby

Prawo podziału Nernsta obowiązuje jedynie w warunkach stałej temperatury, stałego ciśnienia i stałego pH, w przypadku rozcieńczonych roztworów. W sposób ścisły dotyczy czystej substancji zdyspergowanej między dwoma czystymi rozpuszczalnikami. Istnienie kilku różnych substancji rozpuszczonych w jednej lub dwóch fazach może wpłynąć na uzyskane wyniki.

Zjawiska dysocjacji lub asocjacji rozpuszczonych cząsteczek prowadzą do odchyleń od prawa podziału Nernsta. Na takie odchylenia wskazuje fakt, że współczynnik podziału staje się zależny od stężenia roztworu.

Ze względu na szereg różnych badanych stanów równowagi, ta metoda badania nie powinna być stosowana w odniesieniu do związków ulegających jonizacji bez zastosowania korekcji. Należy rozważyć użycie roztworów buforowych w miejsce wody dla takich związków; pH buforu powinno różne przynajmniej o jedną jednostkę pH od pKa substancji i być w zgodności z pH badanego środowiska.

1.6. OPIS METODY

1.6.1. **Wstępna ocena współczynnika podziału**

Bardziej wskazana jest ocena współczynnika podziału za pomocą metody obliczeniowej (zob. dodatek 1) lub, jeśli stosowne, ze stosunków rozpuszczalności badanej substancji w czystych rozpuszczalnikach (10).

1.6.2. **Metoda wstrząsania kolby**

1.6.2.1. *Przygotowanie*

N-oktanol: oznaczenie współczynnika podziału należy wykonać przy użyciu odczynnika jakości analitycznej o wysokiej czystości.

Woda: należy użyć wody destylowanej lub dwa razy destylowanej z przyrządu szklanego lub kwarcowego. Jeżeli jest uzasadnione, dla związków ulegających jonizacji, należy użyć roztworów buforowych w miejsce wody.

Uwaga:

Nie można stosować wody pochodzącej bezpośrednio z wymieniacza jonowego.

1.6.2.1.1. Wstępne nasycenie rozpuszczalników

Przed ustaleniem współczynnika podziału wykonuje się wzajemne nasycenie faz układu rozpuszczalników przez wytrząsanie w temperaturze prowadzenia eksperymentu. Aby to uzyskać, wygodnie jest zastosować wytrząsanie dwóch dużych butli magazynowych z n-oktanolem lub wodą wysokiej czystości do analiz z wystarczającą ilością drugiego rozpuszczalnika, przez 24 godziny, na mechanicznej wytrząsarce, a następnie odstawienie ich na okres tak długi, aby doszło do rozdzielenia faz i uzyskania stanu nasycenia.

▼B

1.6.2.1.2. Przygotowanie do badania

Cała objętość układu dwufazowego powinna prawie wypełniać naczynie do badania. Pomoże to w niedopuszczeniu do utraty materiału z powodu jego ulatniania się. Stosunek objętościowy i ilości substancji, które należy zastosować, ustala się na podstawie następujących informacji:

— wstępna ocena współczynnika podziału (zob. powyżej),

— minimalna ilość substancji badanej wymagana do procedury analitycznej, oraz

— ograniczenie maksymalnego stężenia w każdej z faz do 0,01 mola na litr.

Przeprowadza się trzy badania. W pierwszym używa się wyliczonej wielkości stosunku n-oktanolu do wody; w drugiej ten stosunek dzieli się przez dwa; i w trzecim stosunek ten mnoży się przez dwa (np. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Substancja badana

Roztwór podstawowy przygotowuje się w n-oktanolu wstępnie nasyconym wodą. Stężenie takiego roztworu podstawowego musi być precyzyjnie oznaczone, przed użyciem go w oznaczaniu współczynnika podziału. Roztwór ten powinien być przechowywany w warunkach zapewniających jego stabilność.

1.6.2.2. *Warunki badania*

Powinna być utrzymywana stała temperatura badania (± 1 ^{o}C) i mieścić się w zakresie od 20 do 25 ^{o}C.

1.6.2.3. *Procedura pomiarowa*

1.6.2.3.1. Ustalenie równowagi podziału

Dla każdego z warunków badania należy przygotować po dwa naczynia do badań zawierające wymagane, dokładnie odmierzone ilości obu rozpuszczalników, łącznie z niezbędną ilością roztworu podstawowego.

Fazy n-oktanolu powinny być mierzone objętościowo. Naczynia do badania należy albo ustawić na odpowiedniej wytrząsarce, albo wytrząsać w ręce. Przy zastosowaniu wirowania probówki zalecaną metodą jest obrócenie szybko probówki o około 180^{o} względem jej poprzecznej osi, tak by nie doprowadzić do jakiegokolwiek wzrostu ilości powietrza w obu fazach. Doświadczenie pokazało, że 50 takich obrotów jest zwykle wystarczające dla ustalenia równowagi podziału. Dla pewności zaleca się 100 obrotów w ciągu pięciu minut.

1.6.2.3.2. Rozdzielenie faz

Jeżeli jest konieczne w celu rozdzielenia faz, należy zastosować wirowanie mieszaniny. Do tego celu należy użyć wirówki laboratoryjnej utrzymywanej w temperaturze pokojowej bądź też, w razie wykorzystywania wirówki o niekontrolowanej temperaturze, należy zapewnić uzyskanie ponownego stanu równowagi probówek do wirówki w temperaturze badania na co najmniej jedną godzinę przed analizą.

▼B

1.6.2.4. *Analiza*

W celu oznaczenia współczynnika podziału konieczne jest ustalenie stężenia substancji badanej w obu fazach. Można tego dokonać przez pobranie podwielokrotności każdej z obu faz z każdej z probówek dla każdych warunków badania i poddanie tych podwielokrotności analizie ich przy użyciu wybranej procedury. Należy obliczyć całkowitą ilość substancji obecnej w obu fazach i porównać ją z ilością pierwotnie wprowadzonej substancji.

Należy pobrać próbki fazy wodnej przy użyciu procedury zmniejszającej do minimum ryzyko pobrania śladów n-oktanolu: do pobrania próbki fazy wodnej można użyć szklanej strzykawki z wyjmowaną igłą. Strzykawka powinna zostać na początku częściowo wypełniona powietrzem. Należy delikatnie wypchnąć powietrze, wprowadzając igłę przez warstwę n-oktanolu. Pobiera się odpowiednią objętość fazy wodnej do strzykawki. Następnie strzykawkę szybko wyjmuje się z roztworu i odłącza igłę. Zawartość strzykawki można wykorzystać jako próbkę fazy wodnej. Najkorzystniej jest ustalić stężenie w dwóch rozdzielonych fazach przy użyciu metody specyficznej dla substancji. Przykładami właściwych metod analitycznych są:

— metody fotometryczne,

— chromatografia gazowa,

— wysokosprawna chromatografia cieczowa.

1.6.3. **Metoda HPLC**

1.6.3.1. *Przygotowanie*

Przyrząd

Wymagany jest chromatograf cieczowy, wyposażony w bezimpulsową pompę i odpowiednie urządzenie do wykrywania. Zalecane jest użycie zaworu wtryskowego z obiegiem wtrysku. Obecność grup polarnych w fazie stacjonarnej może poważnie zakłócić działanie kolumny HPLC. Zatem fazy stacjonarne powinny posiadać minimalną zawartość grup polarnych (11). Można stosować dostępne w handlu mikrocząsteczkowe wypełnienia dla fazy odwróconej lub gotowe wypełnione kolumny. Kolumna ochronna powinna być umieszczona między systemem wtrysku a kolumną analityczną.

Faza ruchoma

Do przygotowania rozpuszczalnika wymywającego, odgazowywanego przed użyciem, używa się metanolu oraz wody o czystości HPLC. Wykorzystuje się elucję izokratyczną. Należy zastosować stosunki metanol/woda o minimalnej zawartości wody 25 %. Mieszanina metanol-woda o typowym stosunku 3:1 (obj.) jest zadawalająca do wymywania związków o log P 6 w ciągu jednej godziny, przy szybkości przepływu 1 ml/mm. Dla związków o wysokim log P może być konieczne skrócenie czasu elucji (oraz związków odniesienia) poprzez zmniejszenie polarności fazy ruchomej lub długości kolumny.

Substancje o bardzo niskiej rozpuszczalności w n-oktanolu wykazują tendencję do dawania nienormalnie niskich wartości log P_{ow} przy metodzie HPLC; piki takich związków czasem towarzyszą czołu rozpuszczalnika. Zjawisko to jest prawdopodobnie związane z faktem, że proces podziału jest za powolny do uzyskania równowagi w czasie branym pod uwagę przy zwykłym rozdzielaniu metodą HPLC. Zmniejszenie szybkości przepływu i/lub obniżenie stosunku metanol/woda może być zatem w tym przypadku skuteczne do osiągnięcia rzeczywistej wartości.

▼B

Związki badane i odniesienia muszą być rozpuszczalne w fazie ruchomej w stężeniach wystarczających do umożliwienia ich wykrycia. Tylko w wyjątkowych przypadkach można zastosować dodatki do mieszaniny metanol/woda, ponieważ dodatki zmieniają właściwości kolumny. Dla chromatogramów z dodatkami obowiązkowe jest użycie oddzielnej kolumny tego samego typu. Jeśli układ metanol-woda nie jest odpowiedni, można użyć innych mieszanin organicznych rozpuszczalników, na przykład etanol-woda lub acetonitryl-woda.

Wartość pH eluentu jest krytyczna dla związków ulegających jonizacji. Powinno być ono w obrębie zakresu roboczego pH kolumny, które zwykle wynosi między 2 i 8. Zalecane jest buforowanie. Należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do wytrącania się soli i zniszczenia kolumny, co zachodzi dla niektórych mieszanin faza organiczna/bufor. Pomiary HPLC faz stacjonarnych opartych na krzemionce powyżej pH 8 nie są polecane, gdyż użycie zasadowej fazy ruchomej powoduje gwałtowne pogorszenie się wydajności kolumny.

Substancje rozpuszczone

Związki odniesienia powinny być o najwyższej dostępnej czystości. Związki używane do celów badania lub kalibracji są rozpuszczone, o ile to możliwe, w fazie ruchomej.

Warunki badania

Temperatura w trakcie wykonywania pomiarów nie może zmieniać się więcej niż ± 2 K.

1.6.3.2. **Pomiar**

Obliczenie czasu martwego t_o

Czas martwy t_o ustala się albo przez zastosowanie szeregów homologicznych (np. n-alkilometyloketonów), albo nieustalonych związków organicznych (np. tiomocznik lub formamid). Dla obliczenia czasu martwego t_o z użyciem szeregów homologicznych, zestaw co najmniej siedmiu reprezentantów szeregu jest wtryskiwany i oznacza się poszczególne czasy retencji. Wstępne czasy retencji $t_{r(nc + 1)}$ są wykreślane w funkcji $t_{r(n\ c)}$, oraz punkt przecięcia a oraz nachylenie b równania regresji:

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

są ustalane (n_c = ilość atomów węgla). Czas martwy to jest zatem dany przez:

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

▼B

Krzywa kalibracji

Następnym krokiem jest sporządzenie wykresu korelacji wartości log k w zależności od log P dla właściwych związków odniesienia. W praktyce zestaw między 5 a 10 standartowych związków odniesienia, których log P jest wokół oczekiwanego zakresu jest kolejno wtryskiwany i oznaczane są czasy retencji, najkorzystniej przez integrator rejestrujący podłączony do systemu detekcji. Odpowiadające logarytmy masowych stosunków podziałów, log k, są wyliczane i wykreślane w funkcji log P ustalonego metodą wstrząsania kolby. Kalibracja jest prowadzona w regularnych odstępach czasu co najmniej raz dziennie, tak aby możliwe zmiany wydajności kolumny mogły być akceptowane.

Oznaczanie masowego stosunku podziału badanej substancji

Badana substancja jest wtryskiwana do tak małej ilości fazy ruchomej jak to możliwe. Oznacza się czas retencji (podwójnie), pozwalający na obliczenie masowego stosunku podziału k. Z wykresu korelacji związków odniesienia, można interpolować współczynnik podziału badanej substancji. Dla bardzo niskich oraz dla bardzo wysokich współczynników podziału konieczna jest ekstrapolacja. W tych przypadkach należy zwrócić szczególną uwagę na granice ufności linii regresji.

2. **DANE**

Metoda wstrząsania kolby

Niezawodność ustalonych wartości P można sprawdzić przez porównanie średnich wyników dwukrotnych oznaczeń ze średnią wszystkich wyników.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),

— tam gdzie metody nie nadają się do zastosowania (np. dla materiałów powierzchniowo czynnych), należy przedstawić obliczoną lub oszacowaną wartość w oparciu o poszczególne rozpuszczalności w n-oktanolu i wodzie,

— należy podać wszystkie informacje i uwagi istotne dla interpretacji wyników, w szczególności w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu skupienia substancji.

Dla metody wstrząsania kolby:

— wynik wstępnej oceny, o ile wykonano,

— temperatura oznaczania,

— dane na temat procedur analitycznych zastosowanych do oznaczenia stężeń,

— czas i szybkość wirowania, o ile zastosowano,

▼B

— zmierzone stężenia w obu fazach dla każdego oznaczenia (co oznacza, że całkowita liczba 12 stężeń znajdzie się w sprawozdaniu),

— waga substancji badanej, objętość każdej fazy zastosowanej w każdym naczyniu oraz całkowita obliczona objętość substancji badanej obecnej w każdej z faz po uzyskaniu stanu równowagi,

— należy podać obliczone wartości współczynnika podziału (P) oraz średniej dla każdego zestawu warunków badania, podobnie jak średnie z wszystkich oznaczeń. W przypadku gdy istnieją dane przemawiające za zależnością współczynnika podziału od stężenia, należy to odnotować w sprawozdaniu,

— należy podać odchylenia standardowe poszczególnych wartości P ponad ich średnią,

— średnie wartości P uzyskane na podstawie wszystkich oznaczeń należy także podać jako ich logarytm (o podstawie 10),

— teoretyczne obliczenie P_{ow}, gdy wartość ta została oznaczona lub gdy zmierzona wartość jest > 10^4,

— pH używanej wody oraz fazy wodnej w czasie trwania eksperymentu,

— jeżeli używane są bufory, należy podąć uzasadnienie dla ich użycia w miejsce wody, skład, stężenia i pH buforów, pH fazy wodnej przed i po eksperymencie.

Dla metody HPLC:

— wynik wstępnej oceny, o ile wykonano,

— substancje badane i odniesienia oraz ich czystość,

— zakres temperatury oznaczeń,

— pH, przy którym wykonano oznaczenia,

— szczegóły kolumn analitycznej i ochronnej, fazy ruchomej i środków detekcji,

— dane retencji oraz literaturowe wartości log P dla związków odniesienia użytych w kalibracji,

— szczegóły dopasowania linii regresji (log k w zależności od log P),

— dane średniej retencji i interpolowana wartość log P badanego związku,

— opis wyposażenia i warunki pracy,

— profile wymywania,

— ilość badań oraz substancje odniesienia substancji wprowadzonych do kolumny,

— czas martwy i sposób jego pomiaru.

▼B

4. **LITERATURA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test 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, 683.

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

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

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

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

(9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 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, 223–339.

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

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

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

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical prqducts for industrial use -Determination of partition coefficient – Flask shaking method.

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

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

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

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

(19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 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, Base11978.

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

▼B

Dodatek 1

Metody obliczenia/szacowania

WPROWADZENIE

Ogólne wprowadzenie do metod obliczeniowych, dane i przykłady są przedstawione w pozycji „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (a).

Stosuje się obliczoną wartość P_{ow}:

— w celu zadecydowania która z metod doświadczalnych jest właściwa (zakres metody wstrząsania kolby: log P_{ow}: od - 2 do 4, zakres metody HPLC: log P_{ow}: od 0 do 6),

— do wyboru właściwych warunków badania (np. substancji odniesienia dla procedur HPLC, stosunek objętości n-oktanolu do wody dla metody wytrząsania kolby),

— jako wewnętrzne laboratoryjne sprawdzenie możliwych błędów doświadczalnych,

— dla uzyskania oszacowanej P_{ow} w przypadkach, gdy z przyczyn technicznych metody doświadczalne nie mogą być stosowane.

METODA SZACOWANIA

Wstępne oszacowanie współczynnika podziału

Wartość współczynnika podziału może być oszacowana, stosując rozpuszczalności badanej substancji w czystych rozpuszczalnikach:

Do tego:

$$P_{\text{szacowanie}} = \frac{\text{nasycenie}_{\text{n – oktanol}}}{\text{nasycenie}_{\text{woda}}}$$

METODY OBLICZEŃ

Zasada metod obliczeniowych

Wszystkie metody obliczeniowe są oparte o formalną fragmentację cząsteczki na odpowiednie podstruktury, dla których pewne przyrosty log P_{ow} są znane. Log P_{ow} całej cząsteczki jest następnie obliczany jako suma wartości, odpowiadając jej fragmentom plus suma składników korekcji dla oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych.

Wykaz stałych fragmentów i składników korekcji są dostępne w pozycjach bibliograficznych (b), (c), (d) i (e). Niektóre są regularnie aktualizowane (b).

Kryteria jakości

Ogólnie, wiarygodność metod obliczeniowych obniża się ze wzrostem złożoności badanych związków. W przypadku prostych cząsteczek o niskiej masie cząsteczkowej i jednej lub dwu grupach funkcyjnych, można oczekiwać odchylenia od 0,1 do 0,3 jednostek log P_{ow} między wynikami różnych metod fragmentaryzacji i wartościami pomierzonymi. W przypadku bardziej złożonych cząsteczek margines błędu może być większy. Zależy to od rzetelności i dostępności stałych fragmentu, jak również zdolności rozpoznania oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych (np. wiązania wodorowe) i poprawności użycia składników korekcji (oprócz problemów z oprogramowaniem komputerowym CLOGP-3) (b). W przypadku związków zjonizowanych ważne jest właściwe rozważenie ładunku lub stopnia jonizacji.

▼B

Procedury obliczeń

π-Metoda Hanscha

Oryginalna stała podstawienia hydrofobowego, wprowadzona przez Fujita i współpracowników (f) jest zdefiniowana jako:

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

gdzie P_{ow} (PhX) jest współczynnikiem podziału pochodnej aromatycznej, a P_{ow} (PhH) związku macierzystego

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

Zgodnie z tą definicją π-metoda stosowana jest głównie dla podstawienia aromatycznego. N-wartości dla większej liczby podstawników zostało stabelaryzowane w pozycjach bibliograficznych (b), (c) i (d). Są one stosowane dla obliczeń log P_{ow} cząsteczek aromatycznych lub podstruktur.

Metoda Rekkera

Zgodnie z Rekkerem (g) wartość log P_{ow} jest obliczana, jak następuje:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{warunki oddziaływania}),$$

gdzie f_i reprezentuje różne stałe fragmentów cząsteczki, natomiast a_i – częstotliwość ich występowania w badanej cząsteczce. Składniki korekcji mogą być wyrażone jako całkowita wielokrotność pojedynczej stałej C_m (tak zwana „stała magiczna”). Stałe fragmentu f_i, i C_m zostały ustalone z wykazu 1 054 doświadczalnych wartości P_{ow} (825 związków) poprzez wielokrotną analizę regresyjną (c), (h). Ustalenie składników oddziaływań przeprowadzono zgodnie z zestawem zasad opisanych w pozycjach bibliograficznych (e), (h) i (i).

Metoda Hansch-Leo

Zgodnie z Hansch i Leo (c) wartość log P_{ow} jest obliczana z:

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

gdzie f_i przedstawia różne stałe fragmentu cząsteczkowego, F_j składniki korekcji oraz a_i, b_i odpowiadające częstotliwości występowania. Wyprowadzony z doświadczalnych wartości P_{ow}, wykaz atomowych i fragmentów grup wartości oraz wykaz składników korekcji F_j (tak zwanych „współczynników”) zostały ustalone metodą prób i błędów. Składniki korekcji zostały uporządkowane w kilka różnych klas (a), (c). Wzięcie pod uwagę wszystkich zasad i składników korekcji jest względnie skomplikowane i zużywające czas. Opracowano pakiet oprogramowania (b).

Metoda połączona

Obliczenie log P_{ow} złożonych cząsteczek może być znacząco poprawione, jeżeli cząsteczka zostanie rozcięta w większe podstruktury, dla których godne zaufania wartości log P_{ow} są dostępne, albo z tabeli z pozycji bibliograficznych (b), (c), albo z własnych pomiarów. Takie fragmenty (np. heterocykle, antrachinon, azobenzen) mogą być zatem połączone z wartościami π Hanscha lub ze stałymi fragmentów Rekkera lub Leo.

Uwagi:

(i) metody obliczeniowe mogą być stosowane tylko do częściowo lub całkowicie zjonizowanych związków, gdzie możliwe jest branie pod uwagę koniecznych współczynników korekcji;

▼B

(ii) jeżeli można założyć wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, odpowiadające składniki korekcji (od około + 0,6 do + 1,0 log P_{ow}, jednostek) muszą być dodane (a). Wskazania obecności takich wiązań można uzyskać z przestrzennych modeli lub danych spektroskopowych cząsteczki;

(iii) jeżeli jest możliwe występowanie kilku postaci tautomerycznych, podstawą do obliczeń powinna być najbardziej prawdopodobna postać;

(iv) należy starannie prowadzić weryfikacje wykazu stałych dla fragmentów.

Sprawozdanie

Jeżeli stosuje się metody obliczenia/oceny, raport z badań powinien, o ile to możliwe, zawierać następujące informacje:

— opis substancji (mieszanina, zanieczyszczenia itp.),

— wskazanie wszystkich możliwych wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, dysocjacji, ładunkui wszystkich innych niezwykłych oddziaływań (np. tautomeria),

— opis metody obliczenia,

— identyfikacja lub zasób bazy danych,

— cechy wyróżniające wyboru fragmentów,

— pełna dokumentacja obliczenia.

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, 525.

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

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

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

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

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

▼B

Dodatek 2

Zalecane substancje odniesienia dla metody HPLC

Nr	substancja odniesienia	log P_{ow}	pKa
1	2-butanon	0,3	
2	4-acetylopirydyna	0,5	
3	anilina	0,9	
4	acetanilid	1,0	
5	alkohol benzylowy	1,1	
6	p-metoksyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	kwas fenoksyoctowy	1,4	pKa = 3,12
8	fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	benzonitryl	1,6	
11	fenyloacetonitryl	1,6	
12	alkohol 4-metylobenzylowy	1,6	
13	acetofenon	1,7	
14	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	kwas 3-nitrobenzoesowy	1,8	pKa = 3,47
16	4-chloroanilina	1,8	pKa = 4,15
17	nitrobenzen	1,9	
18	alkohol cynamonowy	1,9	
19	kwas benzoesowy	1,9	pKa = 4,19
20	p-krezol	1,9	pKa = 10,17
21	kwas cynamonowy	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	anizol	2,1	
23	benzoesan metylu	2,1	
24	benzen	2,1	
25	kwas 3-metylobenzoesowy	2,4	pKa = 4,27
26	4-chlorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	trichloroetylen	2,4	
28	atrazyna	2,6	
29	benzoesan etylu	2,6	
30	2,6-dichlorobenzonitryl	2,6	
31	kwas 3-chlorobenzoesowy	2,7	pKa = 3,82
32	toluen	2,7	
33	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dichloroanilina	2,8	
35	chlorobenzen	2,8	
36	allilofenyloeter	2,9	
37	bromobenzen	3,0	

▼B

Nr	substancja odniesienia	log P_{ow}	pKa
38	etylobenzen	3,2	
39	benzofenon	3,2	
40	4-fenylofenol	3,2	pKa = 9,54
41	tymol	3,3	
42	1,4-dichlorobenzen	3,4	
43	difenyloamina	3,4	pKa = 0,79
44	naftalen	3,6	
45	benzoesan fenylu	3,6	
46	izopropylobenzen	3,7	
47	2,4,6-trichlorofenol	3,7	pKa = 6
48	bifenyl	4,0	
49	benzoesan benzylu	4,0	
50	2,4-dinitro-6-sec-butylofenol	4,1	
51	1,2,4-trichlorobenzen	4,2	
52	kwas dodekanowy	4,2	
53	difenyloeter	4,2	
54	n-butylobenzen	4,5	
55	fenantren	4,5	
56	fluoranten	4,7	
57	dibenzyl	4,8	
58	2,6-difenylopirydyna	4,9	
59	trifenyloamina	5,7	
60	DDT	6,2	
	Inne substancje odniesienia o niskim log P_{ow}		
1	kwas nikotynowy	- 0,07	

▼B

A.9. TEMPERATURAZAPŁONU

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Jest użyteczne posiadanie wstępnych informacji na temat zapalności substancji przed przeprowadzeniem niniejszego badania. Procedura badania jest odpowiednia dla ciekłych substancji, które mogą być zapalone źródłem zapłonu. Metody badania zamieszczone w niniejszym tekście są godne zaufania tylko dla zakresów zapłonu, które są wyszczególnione w pojedynczych metodach.

Przy wyborze stosowanej metody należy rozważyć możliwość chemicznych reakcji substancją a uchwytem próbki.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Temperatura zapłonu jest najniższą temperaturą, skorygowaną do ciśnienia 101,325 kPa, w której ciecz wydziela pary, w warunkach określonych w metodzie badania, w takiej ilości, że wytwarzana jest mieszanina palna para/powietrze w naczyniu badawczym.

Jednostki: ^{o}C

$t = T - 273{,}15$

(t w ^{o}C i T w ^{o}K)

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

1.4. ZASADA METODY

Substancja jest umieszczana w naczyniu badawczym i podgrzewana lub chłodzona to temperatury badania zgodnej z procedurą opisaną w indywidualnej metodzie badania. Próby zapłonu są przeprowadzane w celu stwierdzenia, czy próbka zapłonie lub nie w temperaturze badania.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

1.5.1. **Powtarzalność**

Powtarzalność zmienia się zgodnie z zakresem temperatury zapłonu i zastosowanej metody badania; maksymalnie 2 ^{o}C.

1.5.2. **Czułość**

Czułość zależy od zastosowanej metody badania.

1.5.3. **Specyficzność**

Specyficzność niektórych metod badania jest ograniczona do niektórych amplitud temperatury zapłonu i zależy od cech samej substancji (np. wysoka lepkość).

▼B

1.6. OPIS METODY

1.6.1. **Przygotowania**

Próbka badanej substancji jest umieszczana w przyrządzie badawczym zgodnie z 1.6.3.1 i/lub 1.6.3.2.

Dla bezpieczeństwa zalecane jest, by w metodzie używać próbki o małej liczności. Około 2 cm^3 stosuje się dla substancji wysokoenergetycznych lub toksycznych.

1.6.2. **Warunki badania**

Przyrząd powinien, tak dalece jak jest to zgodne z bezpieczeństwem, być umieszczony w pozycji wolnej od przeciągów powietrza.

1.6.3. **Przeprowadzenie badania**

1.6.3.1. *Metoda równowagi*

Zob. ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Metoda nierównowagi*

Przyrząd Abela:

Zob. BS 2000 część 170, NF M07-011, NF T66-009.

Przyrząd Abel-Pensky:

Zob. EN 57, DIN 51755 część 1 (dla temperatur od 5 do 65 °C), DIN 51755 część 2 (dla temperatur poniżej 5 °C), NF M07-036.

Przyrząd Tag:

Zob. ASTM D 56.

Przyrząd Pensky-Martens:

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

Uwagi:

Jeżeli temperatura zapłonu, oznaczona metoda nierównowagi, według 1.6.3.2, wynosi 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C lub 55 ± 2 °C, należy je potwierdzić metodą równowagi, stosując ten sam przyrząd.

Tylko te metody, które podają temperaturę jako temperaturę zapłonu, stosuje się do zgłoszenia.

Dla oznaczenia temperatury zapłonu lepkich cieczy (farby, gumy oraz podobne) zawierających rozpuszczalniki można używać tylko przyrządów i metod badań stosownych dla oznaczania temperatury zapłonu cieczy lepkich.

Zob. ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 część 1.

▼B

2. **DAN**

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),

— stwierdzenie zastosowania danej metody, jak również o wszystkich możliwych odchyleniach,

— wyniki i wszystkie dodatkowe uwagi dotyczące interpretacji wyników.

4. **LITERATURA**

Brak.

▼B

A.10. ZAPALNOŚĆ (CIAŁA STAŁE)

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Dla przeprowadzenia badania przydatne jest posiadanie wstępnych informacji na temat ewentualnych właściwości wybuchowych substancji.

Niniejsze badanie należy stosować jedynie do substancji sproszkowanych, ziarnistych i pastopodobnych.

Aby nie uwzględniać wszystkich substancji, które można zapalić, a tylko te, które palą się szybko lub te, których zachowanie się przy spalaniu jest z jakichkolwiek względów szczególnie niebezpieczne, jedynie substancje, których szybkość spalania przekracza pewne wartości graniczne, uważa się za wysoce łatwopalne.

Jest szczególnie niebezpieczne, jeżeli inkandescencja rozchodzi się poprzez proszek metalu, z powodu trudności z ugaszeniem ognia. Proszki metali należy uznać za wysoce łatwopalne, jeżeli podtrzymują one rozszerzanie inkandescencji w masie w czasie określonego czasu.

1.2. DEFINICJA I JEDNOSTKI

Czas spalania jest wyrażony w sekundach.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie wyszczególniono.

1.4. ZASADA METODY

Substancja jest formowana w nieprzerwaną wstęgę lub proszkową smugę o długości około 250 mm i przeprowadza się wstępne badanie klasyfikacyjne do określenia, czy zachodzi zapłon przez płomień gazu, rozprzestrzenianie przez przypalanie płomieniem lub tlenie się. Jeżeli zachodzi rozprzestrzenianie ponad 200 mm w sformowanym materiale w obrębie określonego czasu, przeprowadzany jest program pełnego badania w celu określenia szybkości spalania.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Nie ustalono.

▼B

1.6. OPIS METODY

1.6.1. **Wstępne badanie klasyfikacyjne**

Substancja jest formowana w nieprzerwaną wstęgę lub proszkową smugę o długości około 250 mm, 20 mm szerokości i 10 mm wysokości na niepalnej, nieporowatej płycie bazowej o niskim przewodnictwie ciepła. Gorącym płomieniem palnika gazowego (minimalna średnica 5mm), działa się na jeden z końców smugi proszku do momentu zapalenia się proszku lub przez maksimum 2 minuty (5 minut dla proszków metali lub stopów metali). Należy zanotować, czy spalanie rozchodzi wzdłuż 200 mm smugi w obrębie czasu badania 4 minut (lub 40 minut dla proszków metali). Jeżeli substancja nie zapala się i nie podtrzymuje spalania albo przez spalanie z płomieniem lub z tleniem się wzdłuż 200 mm smugi proszku w obrębie czasu 4 minut (lub 40 minut) czasu trwania badania, wtedy substancji nie uważa się za wysoce łatwopalną i dalsze badania nie są wymagane. Jeżeli substancja podtrzymuje spalenie się smugi proszku długości 200 mm w czasie mniejszym od 4 minut, lub mniejszym od 40 minut dla proszków metali, należy przeprowadzić procedurę niżej opisaną (ppkt 1.6.2. i następne).

1.6.2. **Badanie szybkości spalania**

1.6.2.1. *Przygotowanie*

Sproszkowanymi lub ziarnistymi substancjami swobodnie napełnia się formę długą na 250 mm, o trójkątnym przekroju wewnętrznej wysokości 10 mm i szerokości 20 mm. Z obu stron formy w kierunku wzdłużnym montuje się dwie metalowe płyty z ograniczeniami poprzecznymi, które wystają 2 mm poza górną krawędź obszaru przekroju trójkątnego (rysunek). Formę zrzuca się następnie trzykrotnie z wysokości 2 cm na twardą powierzchnię. W razie potrzeby napełnia się wtedy formę ponownie. Poprzeczne ograniczenia są następnie zdejmowane i zeskrobuje się nadmiar substancji. Płytę bazową, niepalną, nieporowatą i o niskim przewodnictwie cieplnym umieszcza się na górze formy, przyrząd odwraca się i zdejmuje formę.

Substancjami pastopodobnymi powleka się w postaci liny o długości 250 mm i przekroju około 1 cm^2, niepalną, nieporowatą i o niskim przewodnictwie cieplnym płytę bazową.

1.6.2.2. *Warunki badania*

W przypadku substancji wrażliwych na wilgoć badanie należy przeprowadzić jak najszybciej po ich wyjęciu z pojemnika.

1.6.2.3. *Przeprowadzenie badania*

Ustawić stos w kierunku prostopadłym do ciągu powietrza w szafie wyciągowej.

Szybkość przepływu powietrza powinna być wystarczająca do zapobieżenia przedostaniu się dymu do laboratorium i nie powinna być zmieniana w trakcie badania. Wokół przyrządu należy ustawić ekran chroniący przed ciągiem powietrza.

Stosuje się gorący płomień z palnika gazowego (minimalna średnica 5 mm) do zapalenia z jednego końca stosu. Gdy stos spali się na długości 80 mm, na następnych 100 mm mierzy się szybkość spalania.

▼B

Badanie przeprowadza się sześć razy, używając za każdym razem czystej, chłodnej płyty, niezależnie od wcześniej obserwowanego pozytywnego wyniku.

2. **DANE**

Istotne z punktu widzenia oceny są czas spalania z wstępnego badania klasyfikacyjnego (1.6.1) i najkrótszy z sześciu zbadanych (1.6.2.3) czas spalania.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),

— opis substancji badanej i jej stanu fizycznego, w tym zawartości wilgoci,

— wyniki z wstępnego badania klasyfikacyjnego i z badania szybkości spalania jeśli przeprowadzono,

— wszelkie dodatkowe uwagi istotne dla interpretacji wyników.

3.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Sproszkowane, ziarniste lub pastopodobne substancje są uważane za wysoce łatwopalne, jeżeli czas spalania w jakimkolwiek badaniu przeprowadzonym zgodnie z procedurą opisaną w 1.6.2 jest mniejszy niż 45 sekund. Proszki metali lub stopów metali, uważa się za wysoce łatwopalne, jeżeli zapalają się i płomień lub strefa reakcji rozszerza się w całej próbce w czasie 10 minut lub mniejszym.

4. **LITERATURA**

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

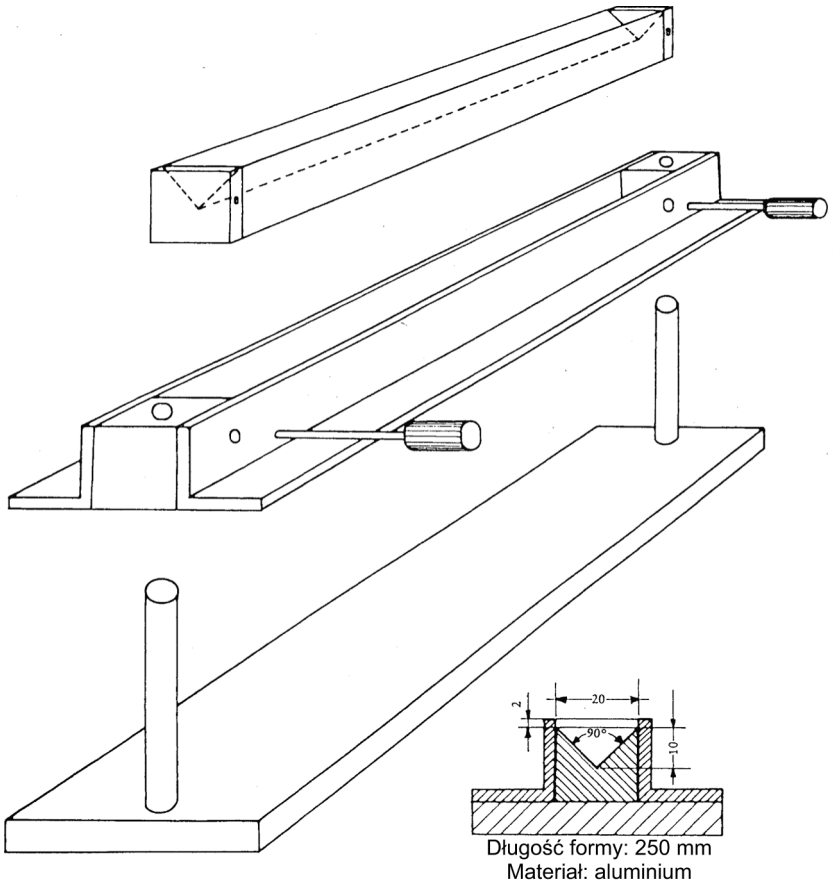
▼B

Dodatek

Rysunek

Forma i akcesoria do przygotowania stosu

(wszystkie wymiary w milimetrach)



▼B

A.11. ZAPALNOŚĆ (GAZY)

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Niniejsza metoda pozwala na oznaczenie, czy gazy zmieszane z powietrzem w temperaturze pokojowej (około 20 °C) i pod ciśnieniem atmosferycznym są palne, a jeśli tak, to w jakim zakresie stężeń. Mieszaniny badanego gazu z powietrzem we wzrastającym stężeniu poddaje się działaniu iskry elektrycznej i obserwuje się, czy dochodzi do zapłonu.

1.2. DEFINICJA I JEDNOSTKI

Zakres palności to zakres stężenia między dolną i górną granicą wybuchowości. Dolna i górna granica wybuchowości to granice stężenia palnego gazu zmieszanego z powietrzem, przy których nie dochodzi do propagacji płomienia.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie wyszczególniono.

1.4. ZASADA METODY

Stężenie gazu w powietrzu zwiększa się w kolejnych etapach, przy czym na każdym etapie mieszaninę tę poddaje się działaniu iskry elektrycznej.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Nie ustalono.

1.6. OPIS METODY

1.6.1. **Przyrząd**

Naczynie do badania to prosty cylinder szklany o minimalnej średnicy wewnętrznej wynoszącej 50 mm i minimalnej wysokości 300 mm. Elektrody zapłonowe są umieszczone w odległości 3 do 5 mm od siebie, 60 mm ponad dnem cylindra. Cylinder jest wyposażony w otwór dekompresyjny. Przyrząd musi być osłonięty w taki sposób, aby ograniczyć wszelkie szkody związane z ewentualnym wybuchem.

Iskra o stałej indukcji o czasie trwania 0,5 s, generowana z wysokonapięciowego transformatora o napięciu wyjściowym od 10 do 15 kV (maksymalna moc zasilająca 300 W), stosowana jest jako źródło zapłonu. Przykład odpowiedniego przyrządu opisano w pozycji bibliograficznej (2).

1.6.2. **Warunki badania**

Badanie należy wykonać w temperaturze pokojowej (około 20 °C).

▼B

1.6.3. **Przeprowadzenie badania**

Przy użyciu pomp dozujących do szklanego cylindra wprowadza się znane stężenia gazu w powietrzu. Przez mieszaninę przepuszcza się iskrę i obserwuje się, czy od źródła zapłonu oddzieli się płomień i czy będzie on ulegać niezależnej propagacji. Stężenie gazu zmienia się etapowo o 1 % obj., aż dojdzie do zapłonu w sposób opisany powyżej.

Jeżeli budowa chemiczna gazu wskazuje, że może on być niepalny, a skład mieszaniny stechiometrycznej z powietrzem może być obliczony, należy zbadać tylko mieszaniny w zakresie 10 % poniżej składu stechiometrycznego oraz 10 % powyżej tego składu, w krokach co 1 %.

2. **DANE**

Jedyną istotną informacją dla ustalenia omawianej właściwości jest informacja na temat propagacji płomienia.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),

— opis zastosowanego przyrządu, z podaniem wymiarów,

— temperatura, w której wykonano badanie,

— stężenia badane i uzyskane wyniki,

— wynik badania: gaz niepalny lub gaz wysoce łatwopalny,

— jeżeli ustalono, że gaz jest niepalny, należy wtedy potwierdzić zakres stężenia, w którym badano go w odstępach co 1 %,

— należy przedstawić wszelkie informacje i uwagi istotne dla interpretacji wyników.

4. **LITERATURA**

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

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

▼B

A.12. ZAPALNOŚĆ (W KONTAKCIE Z WODĄ)

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Niniejszą metodę badania można wykorzystywać do ustalenia, czy reakcja substancji z wodą prowadzi do tworzenia się niebezpiecznych ilości gazu lub gazów, które mogą być wysoce łatwopalne.

Metodę badania można stosować w odniesieniu zarówno do ciał stałych, jak i cieczy. Metoda ta nie ma zastosowania do substancji, które ulegają spontanicznemu zapłonowi w kontakcie z powietrzem.

1.2. DEFINICJE IJEDNOSTKI

Wysoce łatwopalny: Substancje i preparaty, które, w kontakcie z wodą lub wilgotnym powietrzem, uwalniają wysoce łatwopalne gazy w niebezpiecznych ilościach z minimalną szybkością 1 litr/kg na godzinę.

1.3. ZASADA METODY

Substancję bada się w wieloetapowej sekwencji opisanej poniżej; gdy dojdzie do zapłonu na dowolnym z etapów, kontynuowanie badania nie jest potrzebne. Jeżeli wiadomo, że substancja nie reaguje gwałtownie z wodą, należy postępować zgodnie z etapem 4 (1.3.4).

1.3.1. **Etap 1**

Substancję badaną umieszcza się w rynience z wodą destylowaną w temperaturze 20 ^{o}C i zapisuje się, czy uwolniony gaz zapali się, czy nie.

1.3.2. **Etap 2**

Substancję badaną umieszcza się na bibule filtracyjnej pływającej na powierzchni naczynia zawierającego wodę destylowaną w temperaturze 20 ^{o}C, po czym zapisuje się, czy uwolniony gaz zapali się, czy nie. Rolą bibuły filtracyjnej jest jedynie utrzymywanie substancji w jednym miejscu, tak aby zwiększyć szanse na uzyskanie zapłonu.

1.3.3. **Etap 3**

Z substancji badanej tworzy się stos o wysokości około 2 cm i średnicy 3 cm. Do stosu dodaje się kilka kropli wody i zapisuje się, czy dochodzi do zapalenia się uwolnionego gazu, czy nie.

1.3.4. **Etap 4**

Substancję badaną miesza się z wodą destylowaną w temperaturze 20 ^{o}C, po czym mierzy się szybkość uwalniania gazu w czasie siedmiu godzin w odstępach jednogodzinnych. Jeżeli oznaczana szybkość uwalniania wykazuje niesystematyczne wahania lub wzrasta po siedmiu godzinach, czas pomiaru należy wydłużyć do maksimum pięciu dni. Badanie można przerwać, gdy mierzona szybkość w dowolnym momencie przekroczy 1 litr/kg na godzinę.

▼B

1.4. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie wyszczególniono.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Nie ustalono.

1.6. OPIS METOD

1.6.1. **Etap 1**

1.6.1.1. *Warunki badania*

Badanie wykonywane jest w temperaturze pokojowej (około 20 °C).

1.6.1.2. *Wykonanie badania*

Niewielką ilość (o średnicy około 2 mm) substancji badanej należy umieścić w rynience zawierającej wodę destylowaną. Należy zapisać, czy (i) uwalnia się jakikolwiek gaz oraz czy (ii) dochodzi do zapalenia się gazu. W przypadku gdy dochodzi do zapalenia się gazu, nie są potrzebne dalsze badania substancji, gdyż substancję taką uważa się za niebezpieczną.

1.6.2. **Etap 2**

1.6.2.1. *Przyrząd*

Na powierzchni wody destylowanej w dowolnym, właściwym naczyniu, np. w parownicy o średnicy 100 mm, kładzie się płasko bibułę filtracyjną.

1.6.2.2. *Warunki badania*

Badanie wykonywane jest w temperaturze pokojowej (około 20 °C).

1.6.2.3. *Przeprowadzenie badania*

Niewielką ilość substancji badanej (o średnicy około 2 mm) umieszcza się na środku bibuły filtracyjnej. Należy zapisać, czy (i) uwalnia się jakikolwiek gaz oraz czy (ii) dochodzi do zapalenia się gazu. W przypadku gdy dochodzi do zapalenia się gazu, nie są potrzebne dalsze badania substancji, gdyż substancję taką uważa się za niebezpieczną.

1.6.3. **Etap 3**

1.6.3.1. *Warunki badania*

Badanie wykonywane jest w temperaturze pokojowe (około 20 °C).

1.6.3.2. *Przeprowadzenie badania*

Z substancji badanej należy zrobić stos o wysokości około 2 cm i średnicy 3 cm, z wrębem u góry. Do wgłębienia dodaje się kilka kropli wody i zapisuje się, czy: (i) uwalnia się jakikolwiek gaz oraz czy (ii) dochodzi do zapalenia się gazu. W przypadku gdy dochodzi do zapalenia się gazu, nie są potrzebne dalsze badania substancji, gdyż substancję taką uważa się za niebezpieczną.

▼B

1.6.4. **Etap 4**

1.6.4.1. *Przyrząd*

Przyrząd jest ustawiony jak pokazano na rysunku.

1.6.4.2. *Warunki badania*

Sprawdzić pojemnik substancji badanej na jakikolwiek proszek < 500 μm (wielkość ziarna). Jeżeli proszek tworzy więcej niż 1 % wagowo całości lub jeżeli próbka jest krucha, wtedy całą substancję należy zmielić na proszek przed badaniem dla umożliwienia zmniejszenia wielkości ziarna w czasie przechowywania i posługiwania się nią; w innych przypadkach bada się substancję taką, jak otrzymano. Badanie należy wykonać w temperaturze pokojowej (około 20 °C) i pod ciśnieniem atmosferycznym.

1.6.4.3. *Przeprowadzenie badania*

Od 10 do 20 ml wody umieszcza się we wkraplaczu przyrządu, a 10 g substancji umieszcza się w kolbie stożkowej. Objętość uwalniającego się gazu można zmierzyć dowolną, właściwą metodą. Otwiera się kurek wkraplacza w celu wpuszczenia wody do kolby stożkowej i uruchamia się stoper. Wydzielanie gazu mierzone jest co godzinę w trakcie okresu siedmiu godzin. Jeżeli w ciągu tego okresu czasu, wydzielanie gazu jest nierówne, lub pod koniec tego okresu, szybkość wydzielania gazu wzrasta, wtedy pomiary należy kontynuować do pięciu dni. Jeżeli w dowolnym momencie pomiaru szybkość wydzielania gazu przekracza 1 litr/kg na godzinę, należy przerwać badanie. Badanie należy przeprowadzić trzykrotnie.

Jeżeli nie jest znana chemiczna tożsamość gazu, należy go poddać analizie. Jeżeli gaz zawiera wysoce łatwopalne składniki i nie wiadomo, czy mieszanina jest wysoce łatwopalna, należy przygotować mieszaninę o takim samym składzie i poddać badaniu przy użyciu metody A.11.

2. **DANE**

Substancja jest uważana za niebezpieczną, jeżeli:

— samozapłon ma miejsce na każdy etapie procedury badania,

lub

— występuje wydzielanie gazu palnego o szybkości większej niż 1 litr/kg substancji na godzinę.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),

— szczegóły każdego wstępnego przygotowania badanej substancji,

▼B

— wyniki badań (etapy 1, 2, 3 i 4),

— tożsamość chemiczna wydzielanego gazu,

— szybkość wydzielania gazu, jeżeli przeprowadzono etap 4 (1.6.4),

— wszystkie dodatkowe uwagi stosowne do interpretacji wyników.

4. **LITERATURA**

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

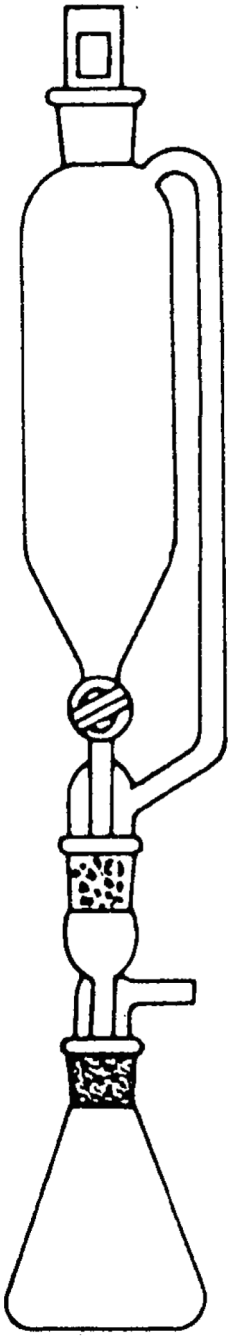
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Dodatek

Rysunek

Przyrząd



▼B

A.13. **WŁAŚCIWOŚCI PIROFORYCZNE CIAŁ STAŁYCH I CIECZY**

1. **METODA**

1.1. WPROWADZENIE

Procedura badań ma zastosowanie do stałych lub ciekłych substancji, które w małych ilościach samorzutnie zapalają się w krótkim czasie po wejściu z powietrzem w temperaturze pokojowej (około 20 °C).

Substancje, które wymagają wystawienia na powietrze na okres godzin lub dni w temperaturze pokojowej lub w podwyższonej temperaturze, zanim zajdzie zapłon nie są objęte niniejszą metodą badania.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Substancje uważa się za posiadające właściwości piroforyczne, jeżeli zapalają się lub ulegają zwęglaniu zgodnie z warunkami opisanymi w 1.6.

Samozapalność cieczy może wymagać również zbadania za pomocą metody A.15 Temperatura samozapłonu (ciecze i gazy).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie wyszczególniono.

1.4. ZASADA METODY

Substancja, czy w postaci ciała stałego czy cieczy, jest dodawana do obojętnego nośnika i poddawana kontaktowi z powietrzem w temperaturze otoczenia na okres pięciu minut. Jeżeli substancje nie zapalają się, absorbuje się je na bibule filtracyjnej i wystawia na powietrze w temperaturze otoczenia (około 20 °C) na czas pięciu minut. Jeżeli ciało stałe lub ciecz zapala się, lub ciecz zapala się lub zwęgla bibułę filtracyjną, wtedy substancję uważa się za piroforyczną.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Powtarzalność: ze względów istotnych dla bezpieczeństwa pojedynczy pozytywny wynik jest wystarczający do uznania substancji za piroforyczną.

1.6. OPIS METODY BADANIA

1.6.1. **Przyrząd**

Tygiel porcelanowy o średnicy około 10 cm napełnia się ziemią okrzemkową do wysokości około 5 mm w temperaturze pokojowej.

Uwaga:

Ziemię okrzemkową lub dowolną inną porównywalną, obojętną substancję, która jest powszechnie dostępna, bierze się jako reprezentacyjną dla gleby, na którą badana substancja może się uwolnić w razie wypadku.

Do badania cieczy, które nie zapalają się w kontakcie z powietrzem, gdy poddaje się je kontaktowi z obojętnym nośnikiem, wymagana jest sucha bibuła filtracyjna.

▼B

1.6.2. **Przeprowadzenie badania**

a) *Sproszkowane ciała stałe*

Od 1 do 2 cm^3 badanej substancji w proszku sypie się z wysokości około 1 m na niepalną powierzchnię i obserwuje się, czy substancja ta ulegnie zapaleniu podczas spadania lub w ciągu pięciu minut od opadnięcia.

Badanie przeprowadza się sześć razy, niezależnie od wystąpienia zapalenia się.

b) *Ciecze*

Około 5 cm^3 badanej cieczy wlewa się do przygotowanego tygla porcelanowego i obserwuje się, czy substancja zapali się w ciągu pięciu minut.

Jeżeli w sześciu badaniach nie nastąpi zapłon, należy przeprowadzić następujące badania:

0,5 ml badanej próbki za pomocą strzykawki przenosi się na wgniecioną bibułę filtracyjną i obserwuje się, czy nastąpi zapalenie się lub zwęglenie bibuły filtracyjnej w czasie pięciu minut po naniesieniu cieczy. Niezależnie od tego, czy zachodzi zapalenie się lub zwęglenie, badanie przeprowadza się trzy razy.

2. **DANE**

2.1. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Wykonywania badań można zaprzestać, gdy tylko w jednym z nich uzyska się dodatni wynik.

2.2. OCENA

Jeżeli substancja zapala się w czasie pięciu minut od dodania obojętnego nośnika i wystawienia na powietrze, lub ciekła substancja zwęgla lub zapala bibułę filtracyjną w czasie pięciu minut po naniesieniu i wystawieniu na powietrze, jest uważana za piroforyczną.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),

— wyniki badań,

— wszystkie dodatkowe uwagi dotyczące interpretacji wyników.

4. **LITERATURA**

(1) NF T 20-039 (SEPT 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, New York.

▼B

A.14. WŁAŚCIWOŚCI WYBUCHOWE

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Metoda dostarcza schematu badania do określenia, czy ciało stałe lub substancja pastopodobna przedstawia niebezpieczeństwo wybuchu, gdy poddaje się ją działaniu płomienia (wrażliwość cieplna) lub uderzeniu lub tarciu (wrażliwość na bodźce mechaniczne), i czy ciekła substancja przedstawia niebezpieczeństwo wybuchu, gdy podda się ją działaniu płomienia lub uderzeniu.

Metoda składa się z trzech części:

a) badanie wrażliwości cieplnej (1);

b) badanie wrażliwości mechanicznej na uderzenia (1);

c) badanie wrażliwości mechanicznej na tarcie (1).

Metoda pozwala uzyskać dane pozwalające na ocenę prawdopodobieństwa zainicjowania wybuchu przy pomocy niektórych powszechnie występujących bodźców. Metoda nie jest przeznaczona do stwierdzenia, czy substancja jest zdolna do wybuchu w każdych warunkach.

Metoda jest właściwa do określenia, czy substancja może przedstawiać niebezpieczeństwo wybuchu (wrażliwość cieplna i mechaniczna) w szczególnych warunkach określonych w dyrektywie. Jest oparta o pewną ilość typów przyrządów, które są szeroko międzynarodowo stosowane (1) i które zwykle dają w pełni znaczące wyniki. Uznane jest, że metoda nie jest ostateczna. Można stosować alternatywne przyrządy do tych celów, zapewniając że są znane międzynarodowo i wyniki mogą być stosownie skorelowane z tymi z wymaganych przyrządów.

Nie ma potrzeby przeprowadzania badań, gdy dostępne są informacje termodynamiczne (np. ciepło tworzenia, ciepło rozkładu) i/lub nieobecne są pewne reaktywne grupy (2) we wzorze strukturalnym, ustanawiające poza wszelkimi wątpliwościami, że substancja jest niezdolna do gwałtownego rozkładu z wydzieleniem gazów lub uwolnieniem ciepła (to jest, materiał nie przedstawia żadnego ryzyka wybuchu). Badanie wrażliwości mechanicznej w odniesieniu do tarcia nie jest wymagane dla cieczy.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Materiały wybuchowe:

Substancje, które wybuchają pod działaniem płomienia lub które są wrażliwe na uderzenie lub tarcie w wymaganych przyrządach (lub bardziej wrażliwe mechanicznie niż 1,3-dinitrobenzen w alternatywnym przyrządzie).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

1,3-dinitrobenzen, techniczny, krystaliczny, przesiany przez sito 0,5 mm, dla metod tarcia i uderzenia.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazyna (RDX, heksogen, cyklonit-CAS 121-82-4), rekrystalizowany z wodnego cykloheksanonu, przesiewany na mokro przez sito 250 mikrometrów (μm) i zatrzymywany na sicie 150 μm oraz suszony w 103 ± 2 ^{o}C (przez 4 godziny) do drugiej serii badań na tarcie i uderzenia.

▼B

1.4. ZASADA METODY

Badania wstępne są konieczne dla ustalenia bezpiecznych warunków przeprowadzenia trzech badań wrażliwości.

1.4.1. **Badania bezpiecznego postępowania z substancją (3)**

Ze względów bezpieczeństwa, przed przeprowadzeniem głównych badań, bardzo małe próbki (około 10 mg) substancji są poddawane ogrzaniu bez zamknięcia w płomieniu gazu, wstrząsowi w dogodnym przyrządzie i tarciu przez użycie młotka i kowadła lub jakiejkolwiek maszyny ciernej. Celem jest stwierdzenie, czy substancja jest tak wrażliwa i wybuchowa, że przepisane badania wrażliwości, szczególnie wrażliwość cieplna, powinny być prowadzone ze specjalnymi środkami bezpieczeństwa, by zapobiec zranieniu operatora.

1.4.2. **Wrażliwość cieplna**

Metoda obejmuje podgrzewanie substancji w stalowej rurze, zamkniętej kryzami z otworami o różnej średnicy, dla określenia, czy substancja jest podatna na wybuch w warunkach intensywnego ogrzewania pod określonym przykryciem.

1.4.3. **Wrażliwość mechaniczna (uderzenie)**

Metoda obejmuje poddawanie substancji uderzeniu spowodowanemu przez zrzucenie określonej masy z określonej wysokości.

1.4.4. **Wrażliwość mechaniczna (tarcie)**

Metoda obejmuje poddawanie ciała stałego lub substancji pastopodobnych tarciu między znormalizowanymi powierzchniami w określonych warunkach obciążenia i ruchu względnego.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Nie ustalono.

1.6. OPIS METODY

1.6.1. **Wrażliwość cieplna (działanie płomienia)**

1.6.1.1. *Przyrząd*

Przyrząd składa się z nienadającej się do ponownego zastosowania rury stalowej z zamknięciami wielokrotnego użytku (rysunek 1), zainstalowanej w urządzeniu do podgrzewania i zabezpieczającym. Każda rura jest wykonana z arkusza stali głęboko tłoczonej (zob. dodatek) i posiada wewnętrzną średnicę 24 mm, długość 75 mm i grubość ścianek 0,5 mm. Rury są kołnierzowane na otwartych końcach dla umożliwienia ich zamknięcia przez zestaw płyty kryzowej. Składa się on z odpornej na ciśnienie płyty kryzy, z centralnie położonym otworem, przykręconej mocno do rury za pomocą dwuczęściowych złącz śrubowych (nakrętka i gwintowany pierścień). Nakrętka i gwintowany pierścień są wykonane ze stali chromomanganowej (zob. dodatek), beziskrowej do temperatury 800 °C. Kryzy są grubości 6 mm, wykonane ze stali żaroodpornej (zob. dodatek), i są dostępne w zakresie różnych średnic otworów.

▼B

1.6.1.2. *Warunki badania*

Zwykle substancje są badane tak jak je otrzymano, chociaż w niektórych przypadkach, na przykład gdy są sprasowane, odlewane lub w inny sposób skondensowane, może być konieczne badanie substancji po skruszeniu. Dla ciał stałych masa materiału użytego w każdym badaniu jest określana w dwuetapowej procedurze przebiegu próbnego. Wytarowana rura jest napełniana 9 cm^3 substancji i substancja jest ubijana siłą 80 N przyłożoną w poprzek całkowitego przekroju rury. Z powodów bezpieczeństwa lub w przypadkach, gdzie postać fizyczna próbki zmienia się przez ściśnięcie, można użyć inną procedurę napełniania; przykładowo, gdy substancja jest bardzo wrażliwa na tarcie, wtedy ubijanie nie jest odpowiednie. Jeżeli materiał jest ściśliwy, wtedy dodaje się go więcej i ubija do momentu wypełnienia rury do 55 mm od góry. Całkowita masa użyta do wypełnienia rury do poziomu 55 mm jest określona i dodaje się następnie dwie dodatkowe porcje, każda ubijana z siłą 80 N. Następnie materiał jest albo dodawany z ubijaniem, albo wyjmowany, w zależności od wymagań, celem pozostawienia rury wypełnionej do poziomu 15 mm od góry. Wykonuje się drugi przebieg próbny, rozpoczynając z ubitą ilością trzeciej masy całkowitej znalezionej w pierwszym etapie przebiegu próbnego. Do tych przyrostów dodaje się dwa więcej z ubijaniem o sile 80 N i poziomem substancji w rurze ustawionym na 15 mm od góry, poprzez dodawanie lub ujmowanie materiału zgodnie z wymaganiem. Ilość ciała stałego ustalona w drugim etapie przebiegu próbnego jest stosowana do każdej próby. Napełnianie przeprowadzono w trzech równych ilościach, każdej ściśniętej do 9 cm^3 z konieczną siłą (można to uprościć przez zastosowanie pierścieni dystansowych).

Ciecze i żele są ładowane do rury na wysokość 60 mm, zwracając szczególną uwagę na żele, by zapobiec tworzeniu się pustych przestrzeni. Gwintowany pierścień jest wsuwany w rurę od dołu, umieszcza się stosowną płytę kryzową i dokręca nakrętkę po nasmarowaniu małą ilością smaru na bazie disiarczku molibdenu. Jest podstawową

zasadą sprawdzenie, czy nie uwięziono substancji między kołnierzem i płytą, lub w gwincie.

Podgrzewanie jest prowadzone za pomocą propanu pobieranego z butli przemysłowej, wyposażonej w zawór regulacyjny ciśnienia (60 do 70 mbar), poprzez miernik i równomiernie rozprowadzany (co wskazuje wizualna obserwacja płomieni z palników) poprzez dysze do czterech palników. Palniki są umieszczone dookoła komory badawczej, jak pokazano na rysunku 1. Cztery palniki posiadają łączne zużycie około 3,2 litra propanu na minutę. Można zastosować alternatywne gazy palne i palniki, ale szybkość ogrzewania musi być jak wyspecyfikowano na rysunku 3. Dla wszystkich przyrządów szybkość ogrzewania musi być okresowo sprawdzana używając rury wypełnione ftalanem dibutylu, jak wskazano na rysunku 3.

1.6.1.3. *Przeprowadzenie badania*

Każde badanie jest przeprowadzane do momentu albo rozerwania rury, albo ogrzania w czasie pięciu minut. Badanie, wynikiem którego jest fragmentacja rury na trzy lub więcej części, które w niektórych przypadkach mogą być połączone jedna do drugiej wąskimi tasiemkami metalu jak pokazano na rysunku 2, ocenia się jako dające wybuch. Badanie wynikiem którego jest mniej fragmentów lub wcale, jest uważane jako niedające wybuchu.

▼B

Wpierw wykonuje się serie trzech badań z płytą kryzową o średnicy 6,0 mm, jeśli nie uzyska się wybuchów, przeprowadza się drugą serię trzech badań z płyta kryzową o średnicy 2,0 mm. Jeżeli wybuch zachodzi w jednej z dwóch serii badań, niewymagane są następne badania.

1.6.1.4. *Ocena*

Wynik badania jest uważany za pozytywny, jeżeli wybuch zachodzi w jednej z dwóch powyższych serii badań.

1.6.2. **Wrażliwość mechaniczna (uderzenie)**

1.6.2.1. *Przyrząd (rysunek 4)*

Podstawowe części przyrządu spadowego młota są wykonane z bloku ze staliwa z podstawą, kowadła, kolumny, prowadnic, bijaków, mechanizmu zwalniającego i uchwytu próbki. Kowadło stalowe 100 mm (średnica) × 70 mm (wysokość) jest przykręcone do góry bloku stalowego 230 mm (długość) × 250 mm (szerokość) × 200 mm (wysokość) z podstawą staliwną 450 mm (długość) × 450 mm (szerokość) × 60 mm (wysokość). Kolumna wykonana z bezszwowej ciągnionej rury stalowej, jest zabezpieczona w uchwycie przykręconym do tylnej ściany bloku stalowego. Cztery śruby mocują przyrząd do stałego betonowego bloku 60 × 60 × 60 cm w taki sposób, że szyny prowadnicy są całkowicie pionowe i bijak opada swobodnie. Stosownymi do użycia są bijaki 5 oraz 10 kg, wykonane z stali uspokojonej. Głowica uderzeniowa każdego bijaka jest z utwardzonej stali HRC 60 do 63, i posiada minimalną średnicę 25 mm.

Próbka podlegająca badaniu jest zawarta w przyrządzie uderzeniowym składającym się z dwóch współosiowych cylindrów ze stali uspokojonej, jeden powyżej drugiego, w wydrążonym stalowym pierścieniu prowadzącym. Cylindry ze stali uspokojonej powinny posiadać średnicę 10 (- 0,003, - 0,005) mm i wysokość 10 mm oraz posiadać polerowane powierzchnie, zaokrąglone krawędzie (promień krzywizny 0,5 mm) i twardość HRC 58 do 65. Drążony cylinder musi posiadać zewnętrzną średnicę 16 mm, polerowany otwór wiertniczy 10 (+ 0,005, + 0,010) mm i wysokość 13 mm. Przyrząd uderzeniowy jest wyposażony w pośrednie kowadło (średnica 26 mm i 26 mm wysokość) wykonane ze stali i centrowane pierścieniem z otworami, pozwalającymi na ucieczkę dymów.

1.6.2.2. *Warunki badania*

Objętość próbki powinna wynosić 40 mm^3 lub objętość właściwą dla dowolnego alternatywnego przyrządu. Stałe substancje powinny być badane w stanie suchym i przygotowywane, jak następuje:

a) sproszkowane substancje należy przesiać (wielkość oczek sita: 0,5 mm); do badania wykorzystuje się całą ilość substancji, która przeszła przez sito;

b) sprasowane, odlewane lub w inny sposób skondensowane substancje są kruszone w małe kawałki i przesiewane; przesiane frakcje średnicy od 0,5 do 1 mm są używane do badania i muszą być reprezentatywne dla substancji oryginalnej.

Substancje zwykle dostarczane jako pasty, powinny być badane w stanie suchym, tam gdzie to możliwe, lub w każdym razie, po usunięciu maksymalnie możliwej ilości rozpuszczalnika. Ciekłe substancje są badane ze szczeliną 1mm między dolnym i górnym stalowym cylindrem.

▼B

1.6.2.3. *Przeprowadzenie badań*

Przeprowadza się serie sześciu badań, spuszczając masę 10 kg z wysokości 0,40 m (40 J). Jeżeli w trakcie sześciu badań przy 40 J uzyska się wybuch, należy wykonać serię dalszych sześciu badań, spuszczając masę 5 kg z 0,15 m (7,5 J). W innym przyrządzie próbka jest porównywana z wybraną substancją odniesienia, stosując ustaloną procedurę (np. technikę w górę-w dół itd.).

1.6.2.4. *Ocena*

Wynik badania uważa się za pozytywny, jeżeli zachodzi wybuch (zapalenie się gwałtownym płomieniem jest równoważne wybuchowi i przedstawiane w sprawozdaniu) przynajmniej raz we wszystkich badaniach z określonym przyrządem uderzeniowym lub próbka jest bardziej wrażliwa niż 1,3-dinitrobenzen lub RDX w alternatywnym badaniu na uderzenie.

1.6.3. **Wrażliwość mechaniczna (tarcie)**

1.6.3.1. *Przyrząd (rysunek 5)*

Przyrząd do tarcia składa się z płyty bazowej staliwnej, na której zamocowany jest przyrząd tarcia. Składa się on z umocowanych porcelanowych prętów i ruchomej porcelanowej płyty. Płyta porcelanowa jest umieszczona w wózku poruszającym się w dwóch prowadnicach. Wózek jest dołączony do silnika elektrycznego poprzez korbowód, krzywkę mimośrodową i odpowiednią przekładnię, tak że porcelanowa płyta przesuwa się tylko raz, w tył i naprzód poniżej porcelanowego pręta w odległości 10 mm. Pręt porcelanowy może być obciążony przykładowo 120 lub 360 N.

Płaska porcelanowa płyta jest wykonana z porcelany technicznej (chropowatość 9 do 32 μm) i posiada wymiary 25 mm (długość) × 25 mm (szerokość) × 5 mm (wysokość). Cylindryczny pręt porcelanowy jest również wykonany z białej technicznej porcelany i ma długość 15 mm, średnicę 10 mm oraz schropowaconą końcową powierzchnię sferyczną o promieniu krzywizny 10 mm.

1.6.3.2. *Warunki badania*

Objętość próbki powinna wynosić 10 mm3 lub objętość odpowiednią dla każdego przyrządu alternatywnego.

Stałe substancje powinny być badane w stanie suchym i przygotowywane jak następuje:

a) sproszkowane substancje należy przesiać (wielkość oczek sita: 0,5 mm); do badania wykorzystuje się całą ilość substancji, która przeszła przez sito;

b) sprasowane, odlewane lub w inny sposób skondensowane substancje są kruszone w małe kawałki i przesiewane; do badań używane są przesiane frakcje średnicy mniejszej od 0,5 mm.

Substancje zwykle dostarczane jako pasty powinny być badane w stanie suchym, tam gdzie to możliwe. Jeżeli substancja nie może być przygotowana w stanie suchym, pasta (po usunięciu maksymalnie możliwej ilości rozpuszczalnika) jest badana jako warstwa 0,5 mm grubości, 2 mm szerokości, 10 mm długości, przygotowana przy użyciu szablonu.

▼B

1.6.3.3. *Przeprowadzenie badań*

Pręt porcelanowy jest położony na badaną próbkę i obciążany. Podczas przeprowadzania badania ślady gąbki na płytce porcelanowej muszą być położone poprzecznie w stosunku do kierunku ruchu. Należy uważać, aby pręt spoczywał na próbce, aby wystarczająco dużo materiału badanego znajdowało się pod prętem i aby płytka poruszała się prawidłowo pod prętem. Dla substancji w postaci past do nanoszenia substancji na płytę stosuje się szablon o grubości 0,5 mm ze szczeliną 2 × 10 mm. Porcelanowa płyta przesuwa się o 10 mm wprzód i do tyłu pod porcelanowym prętem w czasie 0,44 sekundy. Każda część powierzchni płyty i pręta używana jest tylko raz; dwa końce każdego pręta służą dla dwóch prób, a dwie powierzchnie płyty służą każda do trzech prób.

Serię sześciu badań przeprowadza się z obciążeniem 360 N. Jeżeli uzyskuje się pozytywne zdarzenie w czasie trwania tych sześciu badań, następną serię sześciu badań należy wykonać z obciążeniem 120 N. W innych przyrządach, próbka jest porównywana z wybraną substancją odniesienia, stosując ustaloną procedurę (np. technikę „w górę-w dół" itp.).

1.6.3.4. *Ocena*

Wynik badania jest uważany za pozytywny, jeżeli zaszedł wybuch (zapalenie się gwałtownym płomieniem jest równoważne wybuchowi i przedstawiane w sprawozdaniu) przynajmniej raz w jakimkolwiek z badań przy użyciu wyspecyfikowanego przyrządu do tarcia lub odpowiada kryteriom równoważności w alternatywnym badaniu przez tarcie.

2. **DANE**

W zasadzie, w sensie dyrektywy, substancja jest uważana za przedstawiając niebezpieczeństwo wybuchu, jeżeli uzyskano pozytywny wynik w badaniach wrażliwości na ciepło, uderzenie i tarcie.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— tożsamość, skład, czystość, zawartość wilgoci itd., badanej substancji,

— postać fizyczna próbki i czy lub nie była kruszona, rozdrabniana i/lub przesiewana,

— obserwacje z czasu trwania badań wrażliwości cieplnej (np. masa próbki, ilość fragmentów itp.),

— obserwacje z czasu trwania badań wrażliwości mechanicznej (np. tworzenie znacznych ilości dymu lub całkowity rozkład bez detonacji, płomienie, iskry, detonacja, gwałtowne zapalenie itp.),

— wyniki każdego rodzaju badania,

— w przypadku gdy wykorzystano alternatywny przyrząd, należy podać uzasadnienie naukowe oraz dowody na korelację między wynikami uzyskanymi przy pomocy podanego przyrządu i przyrządu równoważnego,

▼B

— wszelkie użyteczne uwagi, takie jak odniesienie do badań produktów podobnych, które mogą być istotne dla prawidłowej interpretacji wyników.

— wszelkie dodatkowe uwagi istotne dla interpretacji wyników.

3.2. INTERPRETACJA I OCENA WYNIKÓW

W sprawozdaniu z badań należy podać wszelkie wyniki uznane za fałszywe, stanowiące anomalię lub niereprezentatywne. W przypadku gdyby którykolwiek z wyników powinien zostać odrzucony, należy podać wszelkie alternatywne lub dodatkowe badania. Pomimo wytłumaczenia anomalnych wyników muszą być zaakceptowane ich wartość nominalne i zastosowane do zgodnej z nimi klasyfikacji substancji.

4. **LITERATURA**

(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

Dodatek

Przykłady specyfikacji materiałowych do badania wrażliwości cieplnej (zob. DIN 1623)

(1) Tube: Material specification No 1.0336.505 g

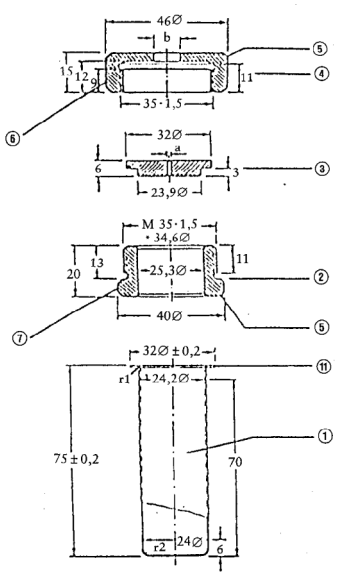
(2) Orifice plate: Material specification No 1.4873

(3) Threaded collar and nut: Material specification No 1.3817

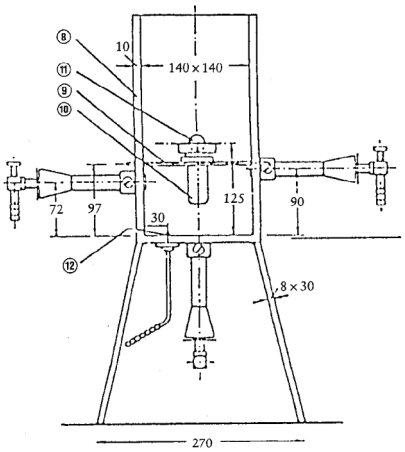
Rysunek 1

Przyrząd badawczy do wrażliwości cieplnej

(wszystkie wymiary w mm)



Rys. 1a Rura stalowa i akcesoria



Rys. 1b Urządzenie do podgrzewania i zabezpieczenia

(1) rura
(1a) zewnętrzny kołnierz
(2) gwintowany pierścień; gwint o niskim tarciu
(3) płyta kryzowa o średnicy a = 2,0 lub 6,0 mm
(4) nakrętka b = 10 mm średnicy
(5) powierzchnia sfazowana
(6) 2 powierzchnie do kłucza wymiaru 41

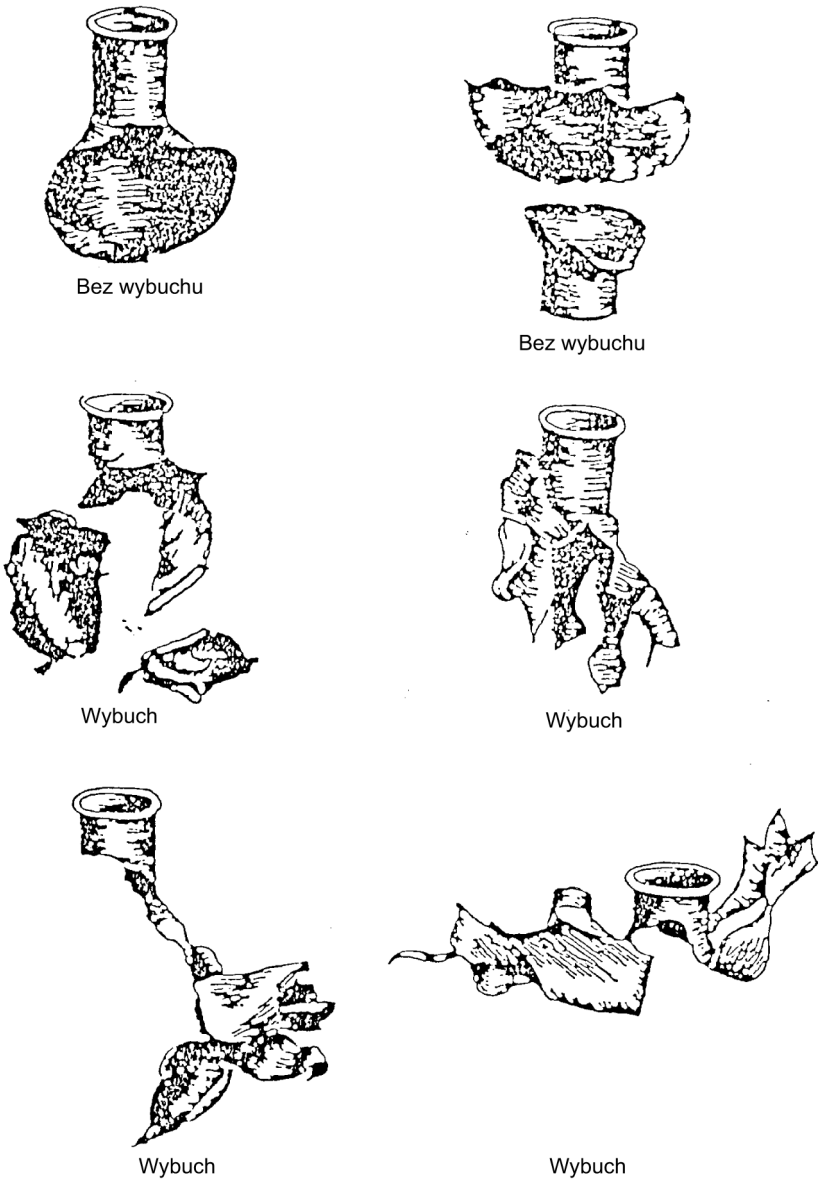
(7) 2 powierzchnie do klucza wymiaru 36
(8) skrzynka zabezpieczająca przed odłamkami
(9) 2 wsporcze pręty dla rury
(10) zamontowana rura
(11) położenie tylnego palnika; inne palniki są widoczne
(12) dysza pilota gazu

▼B

Rysunek 2

Badanie wrażliwości cieplnej

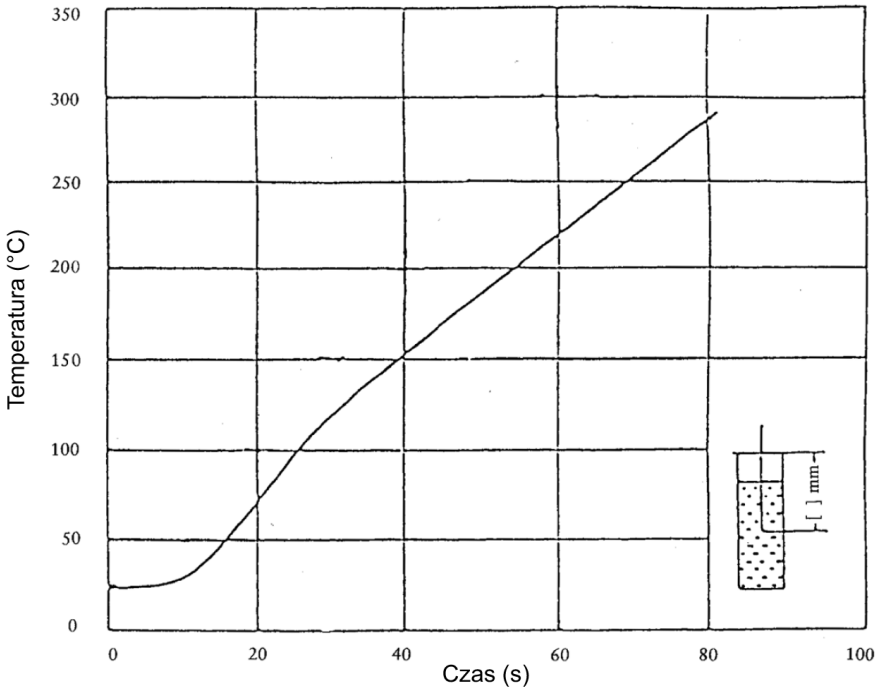
(przykłady fragmentacji)



▼B

Rysunek 3

Kalibracja szybkości podgrzewania dla badania wrażliwości cieplnej



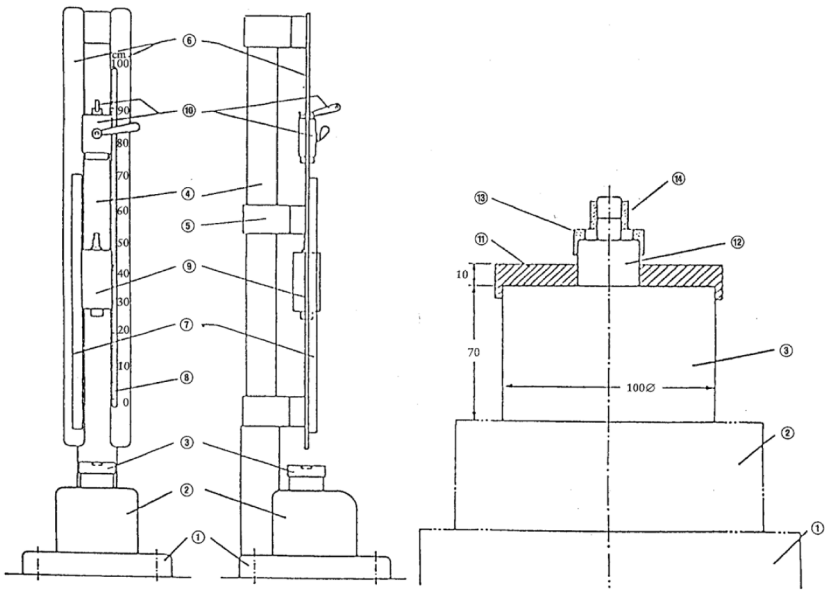
Krzywa temperatura/czas uzyskana przy podgrzewaniu ftalanu dibutylu (27 cm^3) w zamkniętej rurze (1,5 mm płyta kryzowa) przy użyciu szybkości przeprywu propanu 3,2 litra/min. Temperaturę pomierzono termoogniwem chromel/alumel w osłonie ze stali nierdzewnej średnicy l mm, umieszczonego centrycznie 43 mm poniżej obrzeża rury. Szybkość grzania między 135 °C i 285 °C powinna wynosić między 185 i 215 K/min.

▼B

Rysunek 4

Przyrząd do badania wrażliwości na uderzenie

(wszystkie wymiary w mm)



Rys. 4a Młot spadowy, widok ogólny z przodu i z boku

(1) podstawa, 450 x 450 x 60
(2) blok stalowy, 230 x 250 x 200
(3) kowadło, 100 średnica x 70
(4) kolumna
(5) poprzecinica średnia
(6) 2 prowadnice
(7) stojak zębaty

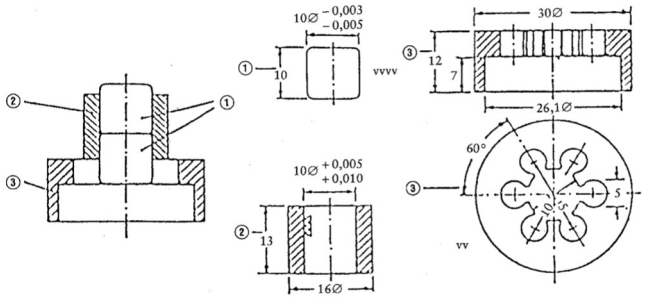
Rys. 4b Młot spadowy, część dolna

(8) skalowana podziałka
(9) młot spadowy (masa spadająca)
(10) mechanizm utrzymujący i zwalniający
(11) płyta ustalająca
(12) kowadło pośrednie (wymienne), 26 średnica x 26
(13) pierścień ustalający z kryzami
(14) przyrząd uderzeniowy

▼B

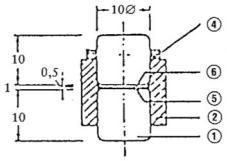
Rysunek 4

Ciąg dalszy

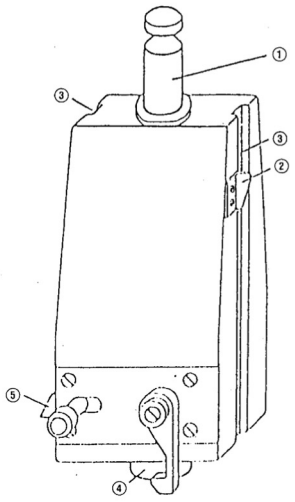


Rys. 4c Przyrząd uderzeniowy dla substancji w postaci sproszkowanej lub pastopodobnej

Rys. 4d Przyrząd uderzeniowy dla substancji ciekłych



(1) cylindry stalowe
(2) pierścień prowadzący dla cylindrów stalowych
(3) pierścień ustalający z kryzami
(a) przekrój pionowy
(b) rzut poziomy
(4) pierścień gumowy
(5) substancja ciekła (40 mm^3)
(6) przestrzeń wolna od cieczy



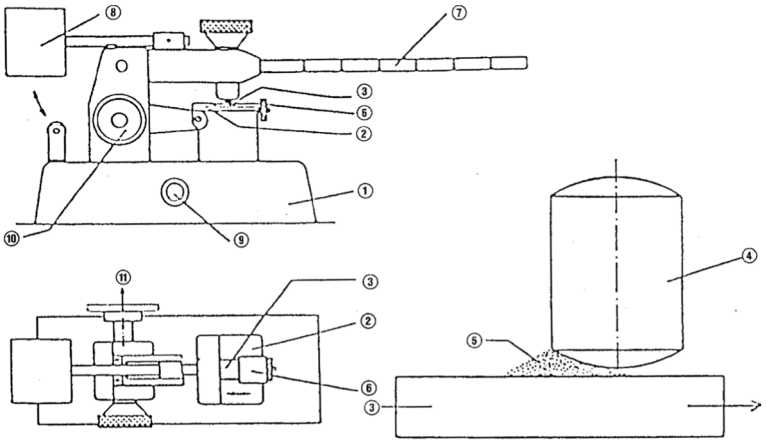
Rys. 4e Młot (masa spadająca 5 kg)

(1) zawieszony czop
(2) znacznik wysokości
(3) rowek ustalający
(4) cylindryczna głowica uderzeniowa
(5) zaczep odboju

▼B

Rysunek 5

Przyrząd do badania wrażliwości na tarcie



Rys. 5a Przyrząd tarcia; rzut pionowy i widok z góry

Rys. 5b Położenie początkowe pręta na próbce

1) stalowa podstawa
(2) ruchomy wózek
(3) płyta porcelanowa, 25 x 25 x 5 mm, umocowana na wózku
(4) amocowany pręt porcelanowy, średnica 10 x 15 mm
(5) badana próbka, około 10 mm^3
(6) uchwył pręta
(7) ramię obciążające
(8) przeciwwaga
(9) włącznik
(10) koło dla ustawienia wózka w pozycje startową
(11) w kierunku elektrycznego silnika napędowego

▼B

A.15. TEMPERATURA SAMOZAPŁONU (CIECZE I GAZY)

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Badaniu temu należy poddać substancje wybuchowe i substancje ulegające samoistnemu zapaleniu w kontakcie z powietrzem w temperaturze otoczenia. Procedura badania nadaje się do stosowania dla gazów, cieczy i par, które w obecności powietrza mogą zapalić się od gorącej powierzchni.

Temperatura samozapłonu może ulec znacznemu zmniejszeniu w obecności zanieczyszczeń katalitycznych, przez powierzchnię materiału lub większą objętość naczynia do badania.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Stopień samozapalności jest wyrażony w warunkach temperatury samozapłonu. Temperatura ta to najniższa temperatura, w której badana substancja zapali się po zmieszaniu jej z powietrzem w warunkach podanych w opisie metody badania.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Substancje odniesienia zacytowano w normach (zob. 1.6.3). Powinny one służyć głównie do sprawdzenia od czasu do czasu zdolności metody i umożliwiać porównanie z wynikami uzyskanymi innymi metodami.

1.4. ZASADA METODY

Metoda wyznacza minimalną temperaturę powierzchni wewnętrznej obudowy, która powoduje zapalenie się gazu, pary lub cieczy wtryśniętej do obudowy.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Powtarzalność zmienia się w zależności zakresu temperatur samozapłonu i zastosowanej metody badania.

Czułość i specyficzność zależą od zastosowanej metody badania.

1.6. OPIS METODY

1.6.1. **Przyrząd**

Przyrząd jest opisany w metodzie podanej w 1.6.3.

1.6.2. **Warunki badania**

Badanie próbki substancji badanej przeprowadza się zgodnie z metodą określoną w 1.6.3.

1.6.3. **Przeprowadzenie badania**

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

▼B

2. **DANE**

Zapisać temperaturę badania, ciśnienie atmosferyczne, ilość wykorzystanej próbki, odstęp czasowy do uzyskania zapłonu.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),

— ilość użytej próbki, ciśnienie atmosferyczne,

— zastosowany przyrząd,

— wyniki pomiarów (temperatury badania, wyniki dotyczące zapłonu, odpowiednie opóźnienia),

— wszelkie dodatkowe uwagi istotne dla interpretacji wyników.

4. **LITERATURA**

Brak.

▼B

A.16. **WZGLĘDNA TEMPERATURA SAMOZAPŁONU DLA CIAŁSTAŁYCH**

1. **METODA**

1.1. WPROWADZENIE

Badaniu temu nie należy poddawać substancji wybuchowych i substancji ulegających samoistnemu zapaleniu w kontakcie z powietrzem w temperaturze otoczenia.

Celem niniejszego badania jest przedstawienie wstępnych informacji na temat samozapłonu substancji stałych w podwyższonych temperaturach.

W przypadku gdy temperatura powstała albo w reakcji substancji z tlenem lub podczas rozkładu egzotermicznego nie zostaje wystarczająco szybko utracona do otoczenia, dochodzi do samopodgrzania, co z kolei prowadzi do samozapłonu. Do samozapłonu dochodzi więc wtedy, gdy szybkość wytwarzania ciepła przekracza szybkość jego utraty.

Procedura badania jest przydatna jako wstępne badanie klasyfikacyjne substancji stałych. Ze względu na złożony charakter zapłonu i spalania się ciał stałych temperatura samozapłonu ustalona przy użyciu tej metody badania powinna być wykorzystywana wyłącznie do celów porównawczych.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Temperatura samozapłonu uzyskana przy użyciu tej metody to minimalna temperatura otoczenia wyrażona w ^{o}C, w której pewna objętość substancji będzie ulegać zapaleniu w określonych warunkach.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY

Pewna ilość substancji do badań jest umieszczana w piecu w temperaturze pokojowej; krzywa temperatura/czas wiążąca warunki w środku próbki jest rejestrowana do momentu, gdy temperatura pieca wzrośnie do 400 ^{o}C, lub do temperatury topnienia, jeśli jest niższa, z szybkością 0,5^{o}C/min. Do celu niniejszego badania, temperatura pieca w której temperatura próbki osiągnie 400 ^{o}C przez samopodgrzanie jest zwana temperaturą samozapłonu.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY

1.6.1. **Przyrząd**

1.6.1.1. *Piec*

Piec laboratoryjny (o objętości około 2 litrów) z programatorem temperatury wyposażony w obieg naturalnego powietrza i zawór przeciwwybuchowy. W celu zapobieżenia ewentualnemu ryzyku wybuchu wszystkie gazy pochodzące z rozkładu nie mogą wejść w kontakt z elementami ogrzewania elektrycznego.

▼B

1.6.1.2. *Kostka z siatki drucianej*

Kawałek drucianej siatki stalowej o otworach oczek 0,045 mm należy wyciąć zgodnie z szablonem przedstawionym na rysunku 1. Siatkę składa się i zabezpiecza drutem u góry otwartego kubka.

1.6.1.3. *Termoogniwa*

Odpowiednie termoogniwa.

1.6.1.4. *Rejestrator*

Dowolny rejestrator dwukanałowy, wykalibrowany od 0 do 600 °C lub o odpowiednim napięciu.

1.6.2. **Warunki badania**

Substancje są badane w stanie otrzymanym.

1.6.3. **Przeprowadzenie badania**

Kostkę napełnia się badaną substancją i łagodnie uklepuje, dodając substancję, aż kostka będzie całkowicie wypełniona. Następnie próbkę zawiesza się pośrodku pieca w temperaturze pokojowej. Jedno termoogniwo umieszcza się pośrodku kostki, a drugie między kostką i ścianą pieca w celu zapisywania temperatury w piecu.

Prowadzi się ciągły zapis temperatury pieca i próbki podczas podwyższania temperatury pieca do 400 °C lub do temperatury topnienia substancji stałej, jeżeli ta ostatnia jest niższa, z szybkością 0,5°C/min.

Gdy substancja się zapali, termoogniwo w próbce pokaże bardzo ostry wzrost temperatury powyżej temperatury w piecu.

2. **DANE**

Temperatura pieca przy której temperatura próbki osiąga 400 °C przez samopodgrzanie jest stosowana do obliczeń (zob. rysunek 2).

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— opis badanej substancji,

— wyniki pomiarów, włącznie z krzywą zależności temperatura/czas,

— wszelkie dodatkowe uwagi istotne dla interpretacji wyników.

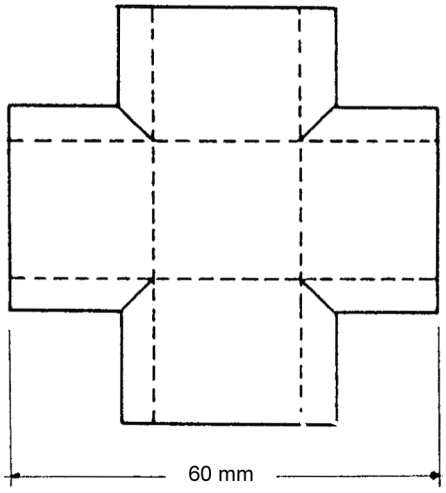
4. **BIBLIOGRAFIA**

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

▼B

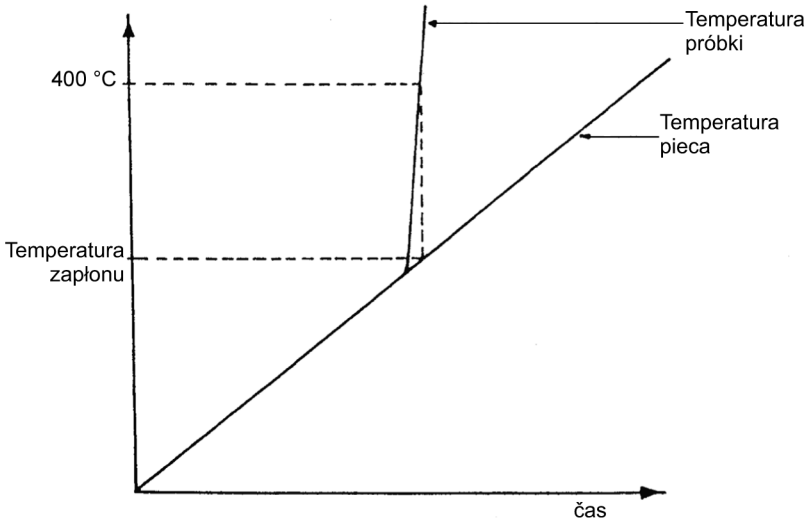
Rysunek 1

Szablon kostki do badań 20 mm



Rysunek 2

Typowa krzywa zależności temperatura/czas



▼B

A.17. WŁAŚCIWOŚCI UTLENIAJĄCE (CIAŁA STAŁE)

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Do przeprowadzenia badania przydatne jest posiadanie wstępnych informacji na temat ewentualnych właściwości wybuchowych substancji.

Niniejsze badanie nie jest przeznaczone dla cieczy, gazów, substancji wysoce łatwopalnych i wybuchowych lub nadtlenków organicznych.

Niniejsze badanie nie musi być prowadzone, gdy analiza wzoru strukturalnego chemicznego ustala ponad wszelkie wątpliwości, że substancja jest niezdolna do egzotermicznego reagowania z materiałem palnym.

W celu upewnienia się, czy badanie nie powinno być przeprowadzone z zastosowaniem szczególnych środków ostrożności, należy wykonać badanie wstępne.

1.2. DEFINICJAI JEDNOSTKI

Czas spalania: czas reakcji, w sekundach, jaki zabiera strefie reakcyjnej przejście wzdłuż stosu, zgodnie z procedurą określoną w 1.6.

Szybkość spalania: wyrażana w milimetrach na sekundę.

Maksymalna szybkość spalania: największe wartości szybkości spalania uzyskane w przypadku mieszanin zawierających od 10 do 90 % wagowych utleniacza.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Azotan baru (czystości analitycznej) jest używany jako substancja odniesienia w próbie właściwej i w badaniu wstępnym.

Mieszaniną odniesienia jest ta mieszanina azotanu baru ze sproszkowaną celulozą, przygotowana zgodnie z ppkt 1.6, która charakteryzuje się maksymalną szybkością spalania (zazwyczaj mieszanina z 60 % azotanem baru wagowo).

1.4. ZASADA METODY

Dla zachowania bezpieczeństwa przeprowadza się badanie wstępne. Nie wymaga się prowadzenia dalszych badań, gdy wstępne badanie wyraźnie wskazuje, że badana substancja posiada właściwości utleniające. Jeżeli to nie jest ten przypadek, substancja musi być przedmiotem pełnego badania.

W pełnym badaniu substancję badaną i określoną substancję palną należy mieszać z różną szybkością. Z każdej mieszaniny formuje się następnie stos, który jest zapalany z jednej strony. Maksymalną ustaloną szybkość spalania porównuje się z maksymalną szybkością spalania mieszaniny odniesienia.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

W razie potrzeby można zastosować dowolną metodę mielenia i mieszania, o ile różnica maksymalnej szybkości spalania w sześciu oddzielnych badaniach będzie odbiegać od wartości średniej arytmetycznej o nie więcej niż 10 %.

▼B

1.6. OPIS METODY

1.6.1. **Przygotowanie**

1.6.1.1. *Substancja badana*

Zmniejszyć wielkość ziarna badanej próbki do wielkości ziarna < 0,125 mm, stosując następującą procedurę: przesiać badaną substancję, rozdrobnić pozostałą frakcję, powtarzać procedurę do momentu, gdy cała porcja do badań przejdzie przez sito.

Można zastosować dowolną metodę mielenia lub przesiewania spełniającą kryteria jakościowe.

Przed przygotowaniem mieszaniny substancję suszy się w temperaturze 105 °C, do uzyskania stałej masy. W przypadku rozkładu badanej substancji w temperaturze poniżej 105 °C substancję tę należy wysuszyć w odpowiedniej, niższej temperaturze.

1.6.1.2. *Substancja palna*

Jako substancję palną wykorzystuje się sproszkowaną celulozę. Celuloza powinna być rodzaju stosowanego w chromatografii cienkowarstwowej lub chromatografii kolumnowej. Odpowiednim sprawdzonym typem jest celuloza z więcej niż 80 % włókien o długości między 0,020 i 0,075 mm. Proszek celulozy jest przesiewany przez sito o wymiarze oczka 0,125 mm. Poprzez całe badanie stosuje się tę samą partię celulozy.

Przed przygotowaniem mieszaniny sproszkowana celuloza jest suszona w 105 °C do chwili uzyskania stałej masy.

Jeżeli w badaniu wstępnym stosowana jest mączka drzewna, należy przygotować mączkę drzewną z miękkiego drewna, poprzez zebranie porcji, która przechodzi oczko siatki 1,6 mm, energicznie wymieszać, a następnie suszyć w 105 °C przez cztery w warstwie nie grubszej niż 25 mm. Ochłodzić i przechowywać w hermetycznym pojemniku, w pełni wypełnionym jak to praktycznie wymagane, najlepiej w obrębie czasu 24 godzin od wysuszenia.

1.6.1.3. *Źródło zapłonu*

Jako źródła zapłonu należy użyć gorącego płomienia gazowego palnika (średnicy minimum 5 mm). Jeżeli stosuje się inne źródło zapłonu (np. przy badaniu w atmosferze obojętnej), należy przedstawić w sprawozdaniu opis i uzasadnienie.

1.6.2. **Przeprowadzenie badania**

Uwaga:

Mieszaniny utleniaczy z celulozą lub mączką drzewną muszą być traktowane jako potencjalnie wybuchowe i należy obchodzić się z nimi z należytą ostrożnością.

1.6.2.1. *Badanie wstępne*

Wysuszona substancja jest wymieszana z wysuszoną celulozą lub mączką drzewną w proporcjach 2 części substancji badanej na 1 część celulozy lub mączki drzewnej wagowo, po czym z mieszaniny kształtuje się mały, stożkowaty stos o wymiarach 3,5 cm (średnica podstawy) × 2,5 cm (wysokość) przez napełnienie, bez ubijania, stożkowatej formy (np. szklanego lejka laboratoryjnego z zatkaną szyjką).

▼B

Stos umieszcza się na chłodnej, niepalnej, nieporowatej płycie bazowej o niskim przewodnictwie cieplnym. Badanie należy przeprowadzić w szafie wyciągowej, tak jak opisano w 1.6.2.2.

Źródło zapłonu wchodzi w kontakt ze stożkiem. Należy zaobserwować i zapisać intensywność i czas trwania ostatecznej reakcji.

Substancja jest uważana za utleniającą, jeżeli reakcja zachodzi gwałtownie.

W każdym przypadku, gdy wynik można poddać w wątpliwość, konieczne jest przeprowadzenie pełnej serii badań opisanych powyżej.

1.6.2.2. *Badanie impulsowe*

Przygotować kolejne porcje mieszaniny utleniacza/celulozy zawierające od 10 do 90 % wagowych części utleniacza w odstępach co 10 %. Dla granicznych przypadków należy użyć mieszanin pośrednich utleniacz/celuloza, dla uzyskania maksymalnej szybkości spalania bardziej precyzyjnie.

Należy uformować stos przy pomocy formy. Forma jest wykonana z metalu, ma długość 250 mm i trójkątny przekrój, przy czym jej wewnętrzna wysokość wynosi 10 mm, a wewnętrzna szerokość – 20 mm. Po obu stronach formy w kierunku wzdłużnym montuje się dwie blaszki jako ograniczenia poprzeczne wystające na 2 mm poza górną krawędź trójkątnego przekroju (rysunek). Niniejszy układ jest luźno napełniany lekkim nadmiarem mieszaniny. Po jednokrotnym upuszczeniu formy z wysokości 2 cm na twardą powierzchnię pozostały nadmiar substancji należy zeskrobać przy pomocy skośnie ustawionego arkusza. Następnie ograniczenia poprzeczne należy usunąć i wygładzić pozostały proszek przy pomocy wałka. Następnie na górze formy umieszcza się niepalną, nieporowatą o niskim przewodnictwie cieplnym, płytę bazową, odwraca przyrząd i zdejmuje formę.

Ustawić stos w kierunku prostopadłym do ciągu powietrza w szafie wyciągowej.

Szybkość przepływu powietrza powinna być wystarczająca do zapobieżenia przedostaniu się dymu do laboratorium i nie powinna być zmieniana w trakcie badania. Wokół przyrządu należy ustawić ekran chroniący przed ciągiem powietrza.

Ze względu na higroskopijność celulozy i badanych substancji, badanie należy przeprowadzić jak najszybciej.

Zapalić jeden z końców stosu przez dotknięcie płomieniem.

Zmierzyć czas reakcji na odległości 200 mm po tym, jak strefa reakcji rozprzestrzeni się z początkowej odległości 30 mm.

Badanie przeprowadza się z substancją odniesienia i przynajmniej raz dla każdego z zakresów mieszanin badanej substancji z celulozą.

Jeżeli maksymalna szybkość spalania okazuje się być znacząco większa niż ta z mieszaniny odniesienia, badanie należy wstrzymać; poza tym badanie musi być powtarzane pięć razy dla każdej z trzech mieszanin dających największą szybkość spalania.

▼B

Jeżeli wynik podejrzewany jest o nieprawdziwie pozytywny, należy powtórzyć badanie, stosując obojętną substancję o podobnej wielkości ziarna, taką jak diatomit w miejsce celulozy. Alternatywnie mieszanina badana substancja/celuloza o największej szybkości spalania powinna być ponownie zbadana w obojętnej atmosferze (< 2 % wagowych zawartości tlenu).

2. **DANE**

Ze względów bezpieczeństwa maksymalna szybkość spalania – nie jej wartość średnia – musi być uważana za charakterystyczną właściwością utleniającą substancji badanej.

Istotne znaczenie dla oceny ma najwyższa wartość szybkości spalania w serii sześciu badań danej mieszaniny.

Sporządzić wykres najwyższej wartości szybkości spalania dla każdej mieszaniny w zależności od stężenia utleniacza. Z wykresu należy wziąć maksymalną szybkość spalania.

Sześć zmierzonych wartości szybkości spalania w obrębie serii uzyskanej z mieszaniną z maksymalną szybkością spalania nie może odbiegać od wartości średniej arytmetycznej o więcej niż 10 %; w innym przypadku należy poprawić metody mielenia i mieszania.

Należy porównać maksymalną uzyskaną szybkość spalania z maksymalną szybkością spalania mieszaniny odniesienia (zob. 1.3).

Jeżeli badania przeprowadzono w obojętnej atmosferze, maksymalną szybkość reakcji porównuje się z tą z mieszaniny odniesienia w atmosferze obojętnej.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— tożsamość, skład, czystość, zawartość wilgoci i tym podobne dane badanej substancji,

— wszelkie procesy przetwarzania, którym była poddawana próbka badana (np. mielenie, suszenie itp.),

— źródło zapłonu używane w badaniach,

— wyniki pomiarów,

— sposób zachodzenia reakcji (np. błyskawiczne spalanie na powierzchni, spalanie w całej masie, wszelkie informacje dotyczące produktów spalania itp.),

— wszelkie dodatkowe uwagi istotne dla interpretacji wyników, włącznie z opisem intensywności reakcji (płomienie, iskry, dymy, powolne tlenie się itp.) oraz przybliżony czas trwania uzyskany we wstępnym badaniu ze względów bezpieczeństwa/klasyfikacyjnym w przypadku zarówno substancji badanej, jak i substancji odniesienia,

— wyniki badań substancji obojętnej, jeśli stosowano,

— wyniki z badań w obojętnej atmosferze, jeśli stosowano.

▼B

3.2. INTERPRETACJA WYNIKU

Substancja jest uważana za substancję utleniającą, gdy:

a) we wstępnym badaniu zachodzi gwałtowna reakcja;

b) w pełnym badaniu maksymalna szybkość spalania badanych mieszanin jest wyższa lub równa maksymalnej szybkości spalania mieszaniny odniesienia z celulozy i azotanu baru.

W celu zapobieżenia wynikom nieprawdziwie pozytywnym wyniki uzyskane przy badaniu substancji zmieszanej z materiałem obojętnym i/lub przy badaniu w atmosferze obojętnej muszą być także rozważone przy interpretacji wyników.

4. **LITERATURA**

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

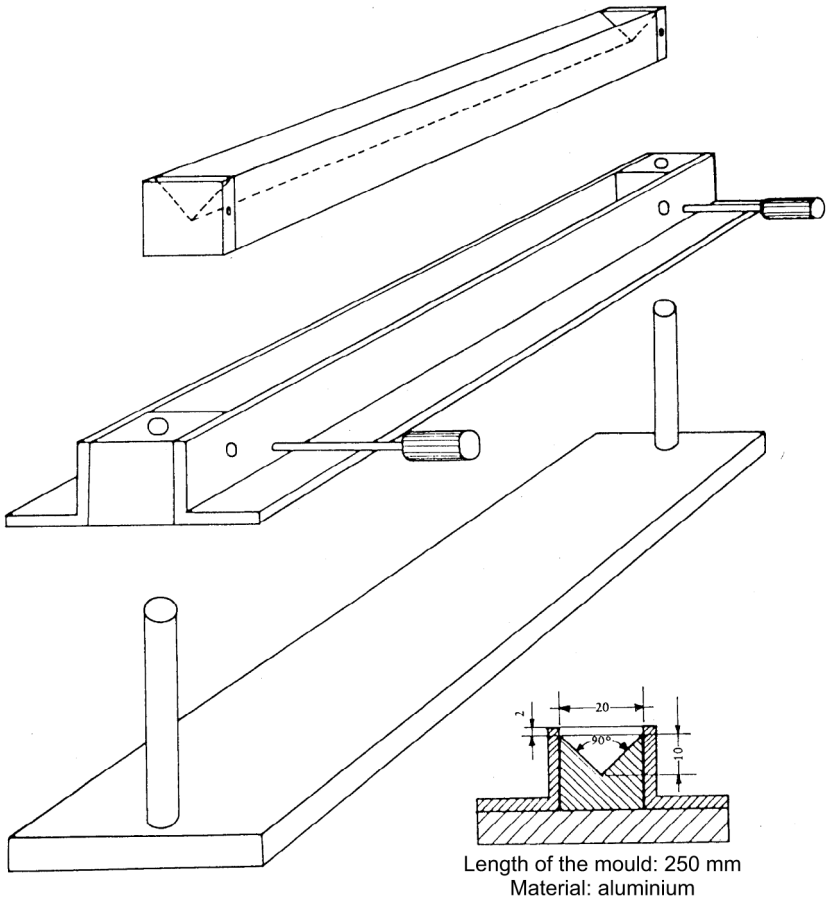
▼B

Dodatek

Rysunek

Forma i akcesoria do przygotowania stosu

(wszystkie wymiary w milimetrach)



▼B

A.18. ŚREDNIA LICZBOWA MASA CZĄSTECZKOWA I ROZKŁAD MASY CZĄSTECZKOWEJ POLIMERÓW

1. METODA

Niniejsza metoda chromatografii żelowo-permeacyjnej (GPC) jest powtórzeniem OECD TG 118 (1996). Podstawowe zasady i dalsze informacje techniczne są podane w pozycji bibliograficznej (1).

1.1. WPROWADZENIE

Skoro właściwości polimerów są tak zróżnicowane, nie istnieje możliwość opisania jednej metody ustalającej dokładnie warunki rozdzielania i oceny, która obejmuje wszystkie ewentualności i specyficzne przypadki występujące przy rozdzielaniu polimerów. W szczególności złożone systemy polimerów nie ulegają często chromatografii żelowo-permeacyjnej (GPC). Jeśli GPC nie jest praktykowana, masa cząsteczkowa może być oznaczona za pomocą innych metod (zob. załącznik). W takich przypadkach powinny zostać podane pełne dane szczegółowe i uzasadnienia dla wykorzystanych metod.

Opisana metoda oparta jest na normie DIN 55672 (1). Szczegółowe informacje o tym, w jaki sposób mają być przeprowadzane doświadczenia oraz w jaki sposób oceniać dane, można znaleźć w powyższej normie DIN. W przypadku gdy niezbędne są modyfikacje warunków doświadczalnych, zmiany te muszą być uzasadnione. Inne normy mogą być używane jedynie, gdy istnieją do nich pełne odniesienia. Opisana metoda wykorzystuje próbki polistyrenu o znanej polidyspersyjności do kalibracji i może istnieć konieczność zmodyfikowania jej, aby była odpowiednia dla niektórych polimerów, np. rozpuszczalnych w wodzie oraz polimerów o długich rozgałęzionych łańcuchach.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Średnia liczbowo masa cząsteczkowa M_n i średnia wagowo masa cząsteczkowa M_w są oznaczane, wykorzystując następujące równania:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

gdzie:

H_i jest poziomem sygnału detektora z linii podstawowej dla objętości retencji V_i,

M_i jest masą cząsteczkową polimerowej frakcji przy objętości retencji V_i, oraz

n jest liczbą punktów pomiarowych.

Rozpiętość rozkładu masy cząsteczkowej, która jest miarą stopnia dyspersji systemu, jest podana na podstawie stosunku M_w/M_n.

▼B

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

GPC jest metodą względną i w związku z tym musi zostać podjęta kalibracja. Zwykle do tego celu jest wykorzystywany polistyren w niewielkim stopniu rozproszony, o liniowej budowie, posiadający średnie masy cząsteczkowe M_n i M_w oraz znany rozkład masy cząsteczkowej. Krzywa kalibracji może być wykorzystywana w oznaczaniu masy cząsteczkowej nieznanej próbki wyłącznie, jeżeli warunki rozdzielenia próbki oraz wzorce zostały wybrane w identyczny sposób.

Określony związek między masą cząsteczkową oraz objętością elucji jest ważny wyłącznie w specyficznych warunkach, w których przeprowadzane jest konkretne doświadczenie. Warunki obejmują przede wszystkim temperaturę, rozpuszczalnik (lub mieszaninę rozpuszczalników), warunki chromatografii oraz kolumnę rozdzielającą lub systemy kolumn.

Masy cząsteczkowe próbki oznaczone w ten sposób są odpowiednimi wartościami oraz są opisane jako „ciężar równoważnikowy polistyrenu”. Oznacza to, że w zależności od strukturalnych i chemicznych różnic między próbką a wzorcami masy cząsteczkowe mogą odchylać się od wartości absolutnych/całkowitych w większym lub mniejszym stopniu. Jeżeli wykorzystywane są inne wzorce, np. glikolu polietylenowego, tlenku polietylenu, metaakrylanu polimetylu, kwasu poliakrylowego, należy podać odpowiednie przyczyny.

1.4. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Zarówno rozkład masy cząsteczkowej próbki jak i średnie masy cząsteczkowe (M_n, M_w) mogą być oznaczane, wykorzystując GPC. GPC jest szczególnym rodzajem chromatografii cieczowej, w której próbka jest rozdzielana według hydrodynamicznych objętości pojedynczych składników (2).

Rozdzielenie następuje, kiedy próbka przechodzi przez kolumnę, która jest wypełniona porowatym materiałem – zazwyczaj organicznym żelem. Małe cząsteczki mogą wnikać w pory, podczas gdy duże cząsteczki są wykluczane. Droga dużych cząsteczek jest z tego względu krótsza i to one są poddane procesowi elucji w pierwszej kolejności. Średnich rozmiarów cząsteczki wnikają w niektóre pory i są później poddawane elucji. Najmniejsze cząsteczki o średnim hydrodynamicznym promieniu, mniejszym niż pory żelu, mogą wnikać we wszystkie pory. Poddawane są elucji na końcu.

W sytuacji idealnej rozdzielanie jest kontrolowane wyłącznie przez wielkość czasteczki gatunku, ale w praktyce trudno jest uniknąć co najmniej niewielkich zakłócających efektów absorbcyjnych. Nierówne wypełnienia kolumny oraz objętości martwe mogą pogorszyć sytuację (2).

Detekcji dokonuje się przez np. współczynnik załamania światła lub pochłaniania promieni UV i daje w wyniku nieskomplikowaną krzywą rozkładu. Jednakże w celu przypisania rzeczywistych wartości masy cząsteczkowej do krzywej niezbędne jest poddanie kolumny kalibracji przez przepuszczanie polimerów o znanej masie cząsteczkowej oraz, w idealnym przypadku, o podobnej strukturze, np. różnych wzorców polistyrenowych. Krzywa Gaussa, powstająca zazwyczaj w ten sposób, czasami wypaczona jest małymi „ogonami” skierowanymi w stronę małych mas cząsteczkowych, oś pionowa wskazuje jakość w masie różnych wyeluowanych odmian polistyrenu, a oś pozioma wskazuje logarytm z masy cząsteczkowej.

▼B

1.5. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

Powtarzalność (względne odchylenie standardowe: RSD) objętości eluowania powinna być lepsza niż 0,3 %. Wymagana powtarzalność analizy musi być zapewniona przez korektę dokonywaną poprzez wzorce wewnętrzne, jeżeli chromatogram jest uzyskiwany w zależności od czasu i nie odpowiada wyżej wspomnianym kryteriom (1). Polidyspersyjności są zależne od mas cząsteczkowych wzorców. W przypadku wzorców polistyrenowych typowe wartości to:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p jest masą cząsteczkową wzorca w maksimum piku)

1.6. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.6.1. **Przygotowanie roztworów wzorcowych polistyrenu**

Wzorce polistyrenu są rozpuszczane przez ostrożne mieszanie w wybranym eluencie. Zalecenia wytwórcy muszą być uwzględnione w trakcie przygotowania roztworu.

Stężenia wybranych wzorców są zależne od wielu czynników, np. od objętości wstrzykiwanej substancji, lepkości roztworu oraz czułości detektora analitycznego. Maksymalna objętość injekcji musi być dostosowana do długości kolumny, w celu uniknięcia przeładowania. Typowe objętości injekcji dla analitycznego rozdzielenia przy użyciu GPC z kolumną o wymiarach 30 cm × 7,8 mm wynoszą na ogół 40–100 µl. Wyższe objętości są możliwe, ale nie powinny przekraczać 250 µl. Optymalny stosunek między objętością injekcji a stężeniem musi być określony przed rzeczywistą kalibracją kolumny.

1.6.2. **Przygotowywanie roztworu próbki**

Zasadniczo te same wymagania stosuje się do przygotowywania roztworów próbek. Próbka jest rozpuszczana w odpowiednim rozpuszczalniku, np. tetrahydrofuranie (THF), przez lekkie wstrząsanie. W żadnym okolicznościach nie powinno się rozpuszczać próbki w wannie ultradźwiękowej. W razie konieczności próbka roztworu jest oczyszczana poprzez membranowy filtr posiadający pory o wymiarach między 0,2 a 2 µ m.

Obecność nierozpuszczalnych cząstek musi być zapisana w sprawozdaniu końcowym, ponieważ może to być odpowiednie dla próbek o dużej masie cząsteczkowej. Powinna zostać wykorzystana odpowiednia metoda w celu określenia udziału procentowego w masie rozpuszczonych cząstek. Roztwór powinien zostać wykorzystany w ciągu 24 godzin.

1.6.3. **Aparatura:**

— zbiornik na rozpuszczalnik,

— odgazowywacz (w danym przypadku),

— pompa,

▼B

— nawilżacz pulsowy (w danym przypadku),

— system wtryskowy,

— kolumny chromatograficzne,

— detektor,

— przepływomierz (w danym przypadku),

— urządzenie rejestrujące dane,

— naczynie na odpady.

Należy zapewnić, że system GPC jest obojętny w odniesieniu do stosowanych rozpuszczalników (np. przez wykorzystanie stalowych kapilar w przypadku rozpuszczalnika THF).

1.6.4. **System wtryskowy i system dostarczający rozpuszczalnik**

Określona objętość roztworu próbki jest umieszczona w kolumnie albo wykorzystując automatyczny próbnik, albo ręcznie w ściśle określonej strefie. Zbyt szybkie wycofywanie lub zniżanie tłoka nurnikowego, jeśli jest wykonywane ręcznie, może spowodować zmiany w obserwowanym rozkładzie masy cząsteczkowej. System dostarczający rozpuszczalnik, na ile jest to możliwe, powinien być wolny od pulsacji, co można osiągnąć przez wbudowanie do niego tłumika pulsacji. Szybkość przepływu wynosi 1 ml/min.

1.6.5. **Kolumna**

W zależności od próbki właściwości polimeru oznacza się albo za pomocą prostej kolumny, albo kilku kolumn połączonych w sekwencję. Pewna ilość materiałów porowatych kolumn o określonych właściwościach dostępna jest w ogólnej sprzedaży (np. rozmiar porów, granica ekskluzji). Wybór żelu rozdzielającego lub długość kolumny jest uzależniona zarówno od właściwości próbki (objętości hydrodynamiczne, rozkład masy cząsteczkowej), jak i od specyficznych warunków rozdzielania, takich jak rozpuszczalnik, temperatura i prędkość przepływu (1) (2) (3).

1.6.6. **Półki teoretyczne**

Kolumna lub połączenie kolumn wykorzystywanych do rozdzielania musi być scharakteryzowana przez ilość półek teoretycznych. Obejmuje to, w przypadku THF jako rozpuszczalnikia eluencyjnego, umieszczenie roztworu etylobenzenu lub innych odpowiednich niepolarnych substancji rozpuszczonych w kolumnie o znanej długości. Liczba półek teoretycznych jest uzyskiwana na podstawie następującego równania:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{lub} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

gdzie:

N = jest liczbą półek teoretycznych,

V_e = jest objętością eluecyjną w maksimum piku,

▼B

W = jest podstawową szerokością piku,

$W_{1/2}$ = jest szerokością piku w połowie wysokości.

1.6.7. **Wydajność rozdzielania**

Oprócz liczby półek teoretycznych, która jest określającą ilościowo szerokością pasma, ważną rolę odgrywa także wydajność rozdzielenia, będąca określana przez nachylenie krzywej kalibracyjnej. Wydajność rozdzielania kolumny jest uzyskiwana z następującego stosunku:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{pole przekroju poprzecznego kolumny}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

gdzie:

$V_{e,\ Mx}$ = jest objętością elucyjną dla polistyrenu o masie cząsteczkowej M_x,

$V_{e,(10.Mx)}$ = jest objętością elucyjną dla polistyrenu o 10-krotnie większej masie cząsteczkowej M_x.

Rozkład systemu jest zwykle określany w następujący sposób:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

Gdzie:

V_{e1}, V_{e2} = są objętościami eluencyjnymi dwóch wzorców polistyrenowych w maksimum piku,

W_1, W_2 = są szerokościami piku linii podstawowej,

M_1, M_2 = są masami cząsteczkowymi w maksimum piku (powinny różnić się współczynnikiem o 10).

Wartość R dla systemu kolumn powinna być większa niż 1, 7 (4).

1.6.8. **Rozpuszczalniki**

Wszystkie rozpuszczalniki muszą posiadać wysoką czystość (dla THF używana jest czystość 99,5 %). Zbiornik na rozpuszczalnik (o ile jest to konieczne – w atmosferze gazu obojętnego) musi być odpowiednio duży dla kalibracji kolumny i analiz wielu próbek. Rozpuszczalnik musi być odgazowany zanim zostanie przeniesiony do kolumny za pomocą pompy.

1.6.9. **Kontrola temperatury**

Temperatura krytycznych komponentów wewnętrznych (pętla wtryskowa, kolumny, detektor i przewody) powinna być stała i zgodna z wyborem rozpuszczalnika.

▼B

1.6.10. **Detektor**

Zadaniem detektora jest rejestracja ilościowa stężenia próbki eluowanej z kolumny. W celu uniknięcia niepotrzebnego poszerzenia pików, objętość kuwety komórki detektora musi być tak mała, jak to tylko jest możliwe. Nie powinna być większa niż 10 μl, z wyjątkiem detektorów mierzących światło rozproszone oraz lepkość. W celu detekcji zazwyczaj używana jest refraktometria różnicowa. Jednakże jeżeli wymagają tego właściwości próbki lub właściwości eluacyjne rozpuszczalnika, mogą być używane inne rodzaje detektora, np. UV/VIS, IR, detektory lepkości itd.

2. **DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDAŃ**

2.1. DANE

Powinno nastąpić odniesienie do normy DIN (1) w celu uzyskania szczegółowych kryteriów oceny, jak również do wymogów odnoszących się do zbierania i przetwarzania danych.

Dla każdej próbki muszą zostać przeprowadzone dwa niezależne doświadczenia. Próbki muszą być analizowane pojedynczo.

Dla każdego pomiaru muszą być zapewnione M_n, M_w, M_w/M_n, M_p.. Niezbędne jest wyraźne wskazanie, że zmierzone wartości są wartościami względnymi, równoważnymi masom cząsteczkowym użytych wzorców.

Po określeniu objętości retencji lub czasów retencji (możliwie poprawionych, wykorzystując wzorzec wewnętrzny) wartości logarytmu M_p (M_p będącego maksymalną wartością piku wzorca kalibracji) są wykreślane w oparciu o jedną z tych wielkości. Niezbędne są co najmniej dwa punkty kalibracji na dekadę masy cząsteczkowej oraz wymagane jest co najmniej pięć punktów pomiarowych dla całkowitej krzywej, która powinna obejmować oszacowaną masę cząsteczkową próbki. Niska wartość punktu końcowego masy cząsteczkowej krzywej wzorcowania jest oznaczana za pomocą n-heksylobenzenu lub innego odpowiedniego niepolarnego roztworu. Średnia liczbowo i średnia wagowo masa cząsteczkowa są zwykle określane za pomocą przetwarzania danych elektronicznych, w oparciu o wzory z sekcji 1.2. W przypadku gdy używana jest ręczna digitalizacji, można powołać się na ASTMD 3536-91 (3).

Krzywa rozkładu musi być dostarczona w formie tabeli lub ilustracji (różnicowa częstotliwość lub procent sumy w oparciu o logarytm M). Na wizerunku graficznym jedna dekada masy cząsteczkowej powinna mieć normalnie około 4 cm szerokości, a maksymalna wartość szczytowa około 8 cm wysokości. W przypadku krzywych całkowego rozkładu różnica w rzędnych między 0 a 100 % powinna wynosić około 10 cm.

2.2. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

2.2.1. **Substancja badana:**

— dostępne informacje dotyczące substancji badanej (tożsamość, dodatki, zanieczyszczenia),

▼B

— opis przetwarzania próbki, uwagi, problemy.

2.2.2. **Oprzyrządowanie:**

— zbiornik z eluentem, obojętny gaz, odgazowywanie eluenta, skład eluenta, zanieczyszczenia,

— pompa, pulsowy tłumik, system wtryskowy,

— kolumny rozdzielające (wytwórca, wszystkie informacje dotyczące właściwościach kolumn, takie jak rozmiar poru, rodzaj rozdzielającego materiału itd., liczba, długość oraz kolejność użytych kolumn),

— liczba teoretycznych półek kolumny (lub połączonych kolumn), wydajność rozdzielania, (rozdzielczość tego systemu),

— informacja dotycząca symetrii pików,

— temperatura kolumny, rodzaj sterowania temperaturą,

— detektor (zasada pomiarów, rodzaj, objętość kuwety),

— przepływomierz w przypadkach, kiedy jest używany (wytwórca, zasada pomiarów),

— system umożliwiający rejestrację i przetwarzanie danych (osprzęt i oprogramowanie).

2.2.3. **Kalibracja systemu:**

— szczegółowy opis metody używanej w celu skonstruowania krzywej kalibracji,

— informacja dotycząca kryteriów jakościowych dla tej metody (np. współczynnik korelacji, błąd sumy kwadratów itd.),

— informacje dotyczące ekstrapolacji, założenia i przybliżenia, poczynione w trakcie procedury doświadczalnej oraz szacowania i przetwarzania danych,

— wszystkie pomiary przeprowadzone w celu konstrukcji krzywej kalibracji powinny być udokumentowane w tabelach, które zawierają następujące informacje dla każdego z punktów kalibracji:

  — nazwa próbki,

  — wytwórca próbki,

  — wartości charakterystyczne wzorców: M_p, M_n, M_w oraz M_w/M_n, dostarczone przez wytwórcę lub na podstawie odpowiednich pomiarów, razem ze szczegółami dotyczącymi metody oznaczania,

  — objętość oraz stężenie wstrzykiwanej próbki,

▼B

— wartość M_p używana dla kalibracji,

— objętość eluencyjna lub poprawiony czas retencji, mierzony przy maksimach piku,

— M_p obliczone przy maksimum piku,

— błąd procentowy wyliczonej M_p oraz wartość kalibracyjna.

2.2.4. **Ocena:**

— ocena na podstawie czasu: wszystkie metody mające na celu zapewnienie wymaganej odtwarzalności (metoda poprawiania, wzorce wewnętrzne itd.)

— informacja dotycząca tego, czy ocena została przeprowadzona na podstawie objętości eluencyjnej lub czasu retencji,

— informacja dotycząca ograniczeń oceny, jeżeli pik nie został poddany analizie w całości,

— opis metod wygładzających, jeżeli są wykorzystywane,

— procedury przygotowawcze oraz wstępnego przetworzenia próbki,

— obecność nierozpuszczalnych cząstek, jeżeli istnieją,

— objętość wtrysku (μl) oraz stężenie wtrysku (mg/ml),

— uwagi wskazujące skutki, które prowadzą do odchyleń od idealnego profilu GPC,

— szczegółowy opis wszystkich zmian w procedurach badawczych,

— szczegóły dotyczące zakresów błędów,

— wszystkie inne informacje oraz uwagi istotne w odniesieniu do interpretacji wyników.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tertrahydrofuran (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 MolecularWeight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Dodatek

Przykłady innych metod określania średniej liczbowo masy cząsteczkowej (M_n) w odniesieniu do polimerów

Chromatografia żelowo-permeacyjna (GPC) jest preferowaną metodą określania M_n, w szczególności kiedy dostępny jest zestaw wzorców, których struktura jest porównywalna ze strukturą polimerów. Jednakże, w przypadku gdy istnieją trudności praktyczne w wykorzystywaniu GPC lub już istnieje przypuszczenie, że substancja nie będzie podlegała kryterium regulującym M_n (a które wymaga potwierdzenia), dostępne są metody alternatywne, takie jak:

1. **Wykorzystywanie własności koligatywnych**

1.1. Ebuliometria/kriometria:

obejmuje pomiar podwyższenia temperatury wrzenia (ebuliometria) lub spadku temperatury zamarzania (kriometria) rozpuszczalnika, kiedy dodany zostaje polimer. Metoda oparta jest na fakcie, że skutek rozpuszczonego polimeru na temperaturę wrzenia/zamarzania płynu zależy od masy cząsteczkowej polimeru (1) (2).

Zastosowanie: $M_n < 20\,000$.

1.2. Zmniejszanie ciśnienia pary:

obejmuje pomiar ciśnienia pary wybranego płynu odniesienia przed i po dodaniu znanych ilości polimeru (1) (2).

Zastosowanie: $M_n < 20\,000$ (teoretycznie; jednakże w praktyce wartości są ograniczone).

1.3. Osmometria membranowa:

opiera się na zasadzie osmozy, tzn. naturalnej skłonności cząsteczek rozpuszczalnika do przenikania przez półprzepuszczalną membranę z rozcieńczonego do stężonego roztworu aż do osiągnięcia równowagi. W trakcie badania rozcieńczony roztwór posiada zerowe stężenie polimeru, natomiast stężony roztwór zawiera polimer. Skutkiem przepuszczenia rozpuszczalnika przez membranę jest zróżnicowanie ciśnienia, które zależne jest od stężenia i masy cząsteczkowej polimeru (1) (3)(4).

Zastosowanie: M_n w zakresie 20 000–200 000.

1.4. Osmometria fazy parowania:

obejmuje porównanie wskaźnika parowania czystego rozpuszczalnika aerozolu do co najmniej trzech aerozoli zawierających polimer o różnych stężeniach (1) (5) (6).

Zastosowanie: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Analiza grupy końcowej**

W celu wykorzystania tej metody potrzeba wiedzy zarówno o całkowitej strukturze polimeru, jak i o charakterze łańcucha kończącego grupy końcowe (która musi być możliwa do odróżnienia od głównego szkieletu, np. przez NMR lub miareczkowanie/różniczkowanie). Oznaczenie stężenia cząsteczkowego grup końcowych obecnych w polimerze może prowadzić do wyprowadzenia wartości masy cząsteczkowej (7) (8) (9).

Zastosowanie, M_n do 50 000 (ze zmniejszającą się wiarygodnością).

3. **Bibliografia**

(1) Billmeyer, F.W. Jr., Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York, 1984.

(2) Glover, C.A., Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York, 1975.

(3) ASTM D 3750-79, Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania, 1979.

(4) Coll, H., Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, 1989, 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. ZAWARTOŚĆ POLIMERÓW O MAŁEJ MASIE CZĄSTECZKOWEJ

1. METODA

Niniejsza metoda chromatografii żelowo-permeacyjnej jest powtórzeniem OECD TG 119 (1996). Podstawowe zasady i dalsze informacje techniczne są podane w odniesieniach.

1.1. WPROWADZENIE

Ze względu na to, że właściwości polimerów są tak zróżnicowane, nie istnieje możliwość opisania pojedynczej metody ustalającej dokładnie warunki rozdzielenia i oceny, która obejmuje wszystkie ewentualności i właściwości pojawiające się w trakcie rozdzielania polimerów. W szczególności złożone systemy polimerów często nie ulegają często chromatografii żelowo-permeacyjnej (GPC). Jeśli GPC nie jest stosowane, masa cząsteczkowa może być ustalona za pomocą innych metod (zob. załącznik). W takich przypadkach powinny zostać podane wszystkie szczegóły i uzasadnienia dla wykorzystanych metod.

Opisana metoda oparta jest na normie DIN 55672 (1). Szczegółowe informacje dotyczące tego, w jaki sposób przeprowadzać doświadczenia oraz w jaki sposób oceniać dane, można znaleźć w niniejszej normie DIN. W przypadku gdy niezbędne są zmiany warunków doświadczeń, wspomniane zmiany muszą być uzasadnione. Inne normy mogą być wykorzystywane tylko w przypadku, gdy istnieją do nich pełne odniesienia. Opisana metoda wykorzystuje próbki polistyrenu o znanej polidyspersyjności w odniesieniu do kalibracji oraz może wystąpić konieczność jej zostać zmodyfikowania, tak aby była odpowiednia dla niektórych polimerów, np. polimerów rozpuszczalnych w wodzie i polimerów o długich rozgałęzieniach łańcucha.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Mała masa cząsteczkowa jest arbitralnie określana jako masa cząsteczkowa poniżej 1 000 daltonów.

Średnia liczbowo masa cząsteczkowa M_n i średnia wagowo masa cząsteczkowa M_w jest określana przy użyciu następujących równań:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

gdzie:

H_I = jest poziomem detektora sygnału z linii podstawowej dla objętości retencyjnej V_i,

M_i = jest masą cząsteczkową polimerowej frakcji przy objętości retencyjnej V_i, i n jest liczbą punktów pomiarowych.

Szerokość rozkładu masy cząsteczkowej, który jest miarą dyspersyjności systemu, jest podana na podstawie stosunku M_w/M_n.

▼B

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Ze względu na to, że GPC jest metodą względną, musi zostać podjęta kalibracja. Zwykle do tego celu używane są wzorce polistyrenowe mało rozproszone, o linearnej budowie, posiadające średnie masy cząsteczkowe M_n i M_w oraz znany rozkład masy cząsteczkowej. Krzywa kalibracji może być wykorzystywana wyłącznie w celu określania masy cząsteczkowej nieznanej próbki, jeżeli warunki rozdzielenia próbki oraz wzorca zostały dobrane w identyczny sposób.

Ustalony związek między masą cząsteczkową oraz objętością elucji jest ważny wyłącznie w specyficznych warunkach danego doświadczenia. Warunki obejmują przede wszystkim temperaturę, rozpuszczalnik (lub mieszaninę rozpuszczalników), warunki chromatografii oraz kolumnę rozdzielającą lub systemy kolumn.

Masy cząsteczkowe próbki ustalone w ten sposób są względnymi wartościami oraz są opisane jako równoważnik mas cząsteczkowych polistyrenowych. Oznacza to, że w zależności od strukturalnych i chemicznych różnic między próbką a wzorcami, masy cząsteczkowe mogą odchylać się od wartości absolutnych w większym lub mniejszym stopniu. Jeśli wykorzystywane są inne wzorce, np. glikolu polietylenu, tlenku polietylenu, metaakrylanu polimetylu czy kwasu poliakrylowego, powinny zostać podane odpowiednie przyczyny.

1.4. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Zarówno rozkład masy cząsteczkowej próbki, jak i średnie masy cząsteczkowe (M_n, M_w) mogą być ustalane, wykorzystując GPC. GPC jest szczególnym rodzajem chromatografii cieczowej, w której próbka jest oddzielana według hydrodynamicznych wielkości pojedynczych składników (2).

Rozdzielenie następuje wówczas, gdy próbka przechodzi przez kolumnę, która jest wypełniona porowatym materiałem – jest to zazwyczaj organiczny żel. Małe cząsteczki mogą wnikać w pory, podczas gdy duże cząsteczki są wykluczane. Ścieżka dużych cząsteczek jest niniejszym krótsza i to one są najpierw poddane procesowi eluacji. Średnie cząsteczki wnikają w niektóre pory i są później poddawane eluacji. Najmniejsze cząsteczki o średnim hydrodynamicznym promieniu, mniejszym niż pory żelu, mogą wnikać we wszystkie pory. Są poddawane eluacji na końcu.

W sytuacji idealnej oddzielanie jest kontrolowane całkowicie rozmiarem odmian cząsteczkowych, ale w praktyce trudno jest uniknąć co najmniej niewielkich efektów absorbcyjnych. Nierówne wypełnienie kolumny oraz objętość martwa mogą tylko pogorszyć sytuację (2).

Na detekcję ma wpływ np. współczynnik załamania lub pochłanianie promieni UV oraz wydajności nieskomplikowanej krzywej rozkładu. Jednakże w celu przypisania rzeczywistych wartości masy cząsteczkowej do krzywej niezbędne jest poddanie kolumny kalibracji przez przepuszczanie polimerów o znanej masie cząsteczkowej oraz, w idealnym przypadku, o podobnej strukturze, np. różnych wzorców polistyrenowych. Krzywa Gaussa, powstająca zazwyczaj w ten sposób, czasami wypaczona jest małymi „ogonami” skierowanymi w stronę małych mas cząsteczkowych, oś pionowa wskazuje jakość w masie różnych wyeluowanych odmian polistyrenu, a oś pozioma wskazuje logarytm z masy cząsteczkowej.

▼B

Zawartość niskich mas cząsteczkowych jest uzyskiwana na podstawie krzywej. Obliczenia mogą być tylko wtedy dokładne, gdy odmiany o małych masach cząsteczkowych odpowiadają polimerowi jako całości.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

Powtarzalność (względne odchylenie standardowe: RSD) objętości eluowania powinna być lepsza niż 0,3 %. Wymagana powtarzalność analizy musi być zapewniona przez korektę dokonywaną poprzez wewnętrzne wzorce, jeżeli chromatogram jest oceniany w oparciu o czas i nie odpowiada wyżej wspomnianym kryteriom (1). Polidyspersyjności są zależne od mas cząsteczkowych wzorców. W przypadku wzorców polistyrenowych typowe wartości to:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p jest masą cząsteczkową wzorca w maksimum piku)

1.6. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.6.1. **Przygotowanie wzorcowych roztworów polistyrenu**

Wzorce polistyrenu są rozpuszczane przez ostrożne mieszanie w wybranym eluencie. Zalecenia wytwórcy muszą zostać uwzględnione w trakcie przygotowywania roztworów.

Stężenia wybranych wzorców są zależne od wielu czynników, np. od objętości injekcji, lepkości roztworu oraz czułości detektora analitycznego. Maksymalna objętość injekcji musi być dostosowana do długości kolumny, w celu uniknięcia przeładowania. Typowe objętości injekcji dla analitycznych rozdzieleń, wykorzystując GPC z kolumną o wymiarach 30 cm × 7,8 mm, wynoszą zazwyczaj 40–100 µl. Wyższe objętości są możliwe, ale nie powinny przekraczać 250 µl. Optymalny stosunek między objętością injekcji oraz stężeniem musi być określony przed rzeczywistą kalibracją kolumny.

1.6.2. **Przygotowywanie roztworu próbki**

Zasadniczo te same wymagania stosuje się do przygotowywania roztworów próbek. Próbka jest rozpuszczana w odpowiednim rozpuszczalniku, np. tetrahydrofuranie (THF), przez lekkie wstrząsanie. W żadnych okolicznościach nie powinno się rozpuszczać próbki w wannie ultradźwiękowej. W razie konieczności, próbka roztworu jest oczyszczana przez membranowy filtr posiadający pory o wymiarach między 0,2 i 2 µ m.

Obecność nierozpuszczalnych cząstek musi być uwzględniona w sprawozdaniu końcowym, jako że może być to ważne w odniesieniu do próbek o wysokiej masie cząsteczkowej. Powinna zostać wykorzystana odpowiednia metoda w celu określenia procentu wagowego nierozpuszczonych cząstek. Roztwór musi zostać wykorzystany w ciągu 24 godzin.

▼B

1.6.3. **Korekta w odniesieniu do zawartości zanieczyszczeń oraz dodatków**

Zazwyczaj niezbędna jest korekta udziału zawartości odmian M < 1 000 w odniesieniu do udziału niepolimerowych szczególnych obecnych składników (np. zanieczyszczenia i/lub dodatki), chyba że zmierzona zawartość wynosi już < 1 %. Osiągane jest to przez bezpośrednią analizę roztworu polimerowego lub eluentu metodą GPC.

W przypadkach gdy eluent po przejściu przez kolumnę jest za bardzo rozcieńczony, aby można go było poddać dalszej analizie, musi zostać zagęszczony. Może okazać się niezbędne odparowanie eluentu do sucha oraz ponowne jego rozpuszczenie. Stężenie eluentu musi zostać uzyskane w warunkach, które zapewniają, że nie pojawią się żadne zmiany w eluencie. Obróbka eluentu po fazie GPC jest zależna od wykorzystanej metody analitycznej wykorzystywanej do oznaczania ilościowego.

1.6.4. **Aparatura**

Aparatura GPC składa się z następujących części składowych:

— zbiornik na rozpuszczalnik,

— odgazowywacz (w miarę potrzeb),

— pompa,

— nawilżacz pulsowy (w miarę potrzeb),

— system wtryskowy,

— kolumny chromatograficzne,

— detektor,

— przepływomierz (w miarę potrzeb),

— urządzenia rejestrujące dane,

— naczynie na odpady.

Musi zostać zapewnione, że system GPC będzie jest obojętny w odniesieniu do stosowanych rozpuszczalników (np. przez wykorzystanie stalowych kapilar w przypadku rozpuszczalnika THF).

1.6.5. **System wtryskowy i system dostarczający rozpuszczalnik**

Określona objętość roztworu próbki jest umieszczona w kolumnie albo przy użyciu automatycznego próbnika, albo ręcznie do ściśle określonej strefy. Zbyt szybkie wstrzykiwanie, jeśli jest wykonywane ręcznie, może spowodować zmiany w obserwowalnym rozkładzie masy cząsteczkowej. System dostarczający rozpuszczalnik, na ile jest to możliwe, powinien być wolny od pulsacji, co można osiągnąć poprzez wbudowanie do niego tłumika pulsacji. Prawidłowa prędkość przepływu wynosi 1 ml/min.

1.6.6. **Kolumna**

W zależności od próbki właściwości polimeru określa się albo za pomocą prostej kolumny, albo kilku kolumn połączonych w sekwencję. Pewna ilość materiałów porowatych kolumn o określonych właściwościach dostępna jest w ogólnej sprzedaży (np. rozmiar porów, granica ekskluzji). Wybór żelu rozdzielającego lub długość kolumny jest uzależniona zarówno od właściwości próbki (objętości hydrodynamiczne, rozkład masy cząsteczkowej), jak i od specyficznych warunków rozdzielania, takich jak rozpuszczalnik, temperatura i prędkość przepływu (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Półki teoretyczne**

Kolumna lub połączenie kolumn wykorzystywanych do rozdzielania musi być scherakteryzowana przez ilość półek teoretycznych. Obejmuje to, w przypadku THF jako rozpuszczalnikia eluencyjnego, umieszczenie roztworu etylobenzenu lub innych odpowiednich niepolarnych substancji rozpuszczonych w kolumnie o znanej długości. Liczba półek teoretycznych jest uzyskiwana na podstawie następującego równania:

$$N = 5{,}54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{lub} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

gdzie:

N = jest liczbą półek teoretycznych,

V_e = jest objętością eluencyjną w maksimum piku,

W = jest wyjściową szerokością piku,

$W_{1/2}$ = jest szerokością piku w połowie wysokości.

1.6.8. **Wydajność rozdzielania**

Oprócz liczby półek teoretycznych, która jest określającą ilościowo szerokością pasma, ważną rolę odgrywa także wydajność rozdzielenia, będąca określana przez nachylenie krzywej kalibracyjnej. Wydajność rozdzielania kolumny jest uzyskiwana z następującego stosunku:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{kolonelės skerspjūvio plotas}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

gdzie:

$V_{e,\ Mx}$ = jest objętością eluencyjną dla polistyrenu o masie cząsteczkowej M_x,

$V_{e,\ (10.Mx)}$ = jest objętością eluencyjną dla polistyrenu o 10-krotnie większej masie cząsteczkowej.

Rozdzielczość systemu jest zwykle określana w następujący sposób:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

gdzie:

V_{e1}, V_{e2} = są objętościami eluencyjnymi dwóch wzorców polistyrenowych w maksimum piku;

W_1, W_2 = są największymi szerokościami piku w lini podstawowej;

M_1, M_2 = są masami cząsteczkowymi przy maksimum piku (powinny różnić się współczynnikiem o 10).

Wartość R w odniesieni do systemu kolumn powinna być wyższa niż 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Rozpuszczalniki**

Wszystkie rozpuszczalniki muszą posiadać wysoką czystość (dla THF używana jest czystość 99,5 %). Zbiornik na rozpuszczalnik (o ile jest to konieczne – w atmosferze gazu obojętnego) musi być odpowiednio duży dla kalibracji kolumny i analiz wielu próbek. Rozpuszczalnik musi być odgazowany zanim zostanie przeniesiony do kolumny za pomocą pompy.

1.6.10. **Kontrola temperatury**

Temperatura krytycznych komponentów wewnętrznych (pętla wtryskowa, kolumny, detektor i przewody) powinna być stała i zgodna z wyborem rozpuszczalnika.

1.6.11. **Detektor**

Zadaniem detektora jest rejestracja ilościowa stężenia próbki eluowanej z kolumny. W celu uniknięcia niepotrzebnego poszerzenia pików objętość kuwety komórki detektora musi być tak mała, jak to tylko jest możliwe. Nie powinna być większa niż 10 μl, z wyjątkiem detektorów mierzących światło rozproszone oraz lepkość. W celu detekcji zazwyczaj używana jest refraktometria różnicowa. Jednakże jeżeli wymagają tego właściwości próbki lub właściwości eluacyjne rozpuszczalnika, mogą być używane inne rodzaje detektora, np. UV/VIS, IR, detektory lepkości itd.

2. **DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDAŃ**

2.1. DANE

Powinno nastąpić odniesienie do normy DIN (1) w celu uzyskania szczegółowych kryteriów oceny, jak również do wymogów odnoszących się do zbierania i przetwarzania danych.

Dla każdej próbki muszą zostać przeprowadzone dwa niezależne doświadczenia. Próbki muszą być analizowane pojedynczo. We wszystkich przypadkach zasadnicze jest ustalenie danych również z prób ślepych, poddawanych przetworzeniu w takich samych warunkach co próbka.

Niezbędne jest wyraźne wskazanie, że zmierzone wartości są wartościami względnymi, równoważnymi masom cząsteczkowym użytych wzorców.

Po określeniu objętości retencji lub czasów retencji (możliwie poprawionych wykorzystując wzorzec wewnętrzny) wartości logarytmu M_p (M_p będącego maksymalną wartością piku wzorca kalibracji) są wykreślane w oparciu o jedną z tych wielkości. Niezbędne są co najmniej dwa punkty kalibracji na dekadę masy cząsteczkowej oraz wymagane jest co najmniej pięć punktów pomiarowych dla całkowitej krzywej, która powinna obejmować oszacowaną masę cząsteczkową próbki. Niska wartość punktu końcowego masy cząsteczkowej krzywej wzorcowania jest określana za pomocą n-heksylobenzenu lub innego odpowiedniego niepolarnego roztworu. Część krzywej odpowiadająca masom cząsteczkowym poniżej 1 000 jest ustalana i korygowana w razie konieczności w odniesieniu do zanieczyszczeń oraz dodatków. Krzywe eluacji są zazwyczaj oceniane za pomocą elektronicznego przetwarzania danych W przypadku gdy używana jest ręczna digitalizacja, można powołać się na ASTMD 3536-91 (3).

▼B

Jeśli jakikolwiek nierozpuszczalny polimer jest zachowany w kolumnie, jego masa cząsteczkowa może być wyższa niż masa cząsteczkowa frakcji rozpuszczalnej, a jeśli nie jest brana pod uwagę może skutkować nadmiernym oszacowaniem zawartości niskiej masy cząsteczkowej. Wskazówki w odniesieniu do korygowania zawartości niskiej masy cząsteczkowej w odniesieniu do nierozpuszczalnego polimeru są przewidziane w załączniku.

Krzywa rozkładu musi być przewidziana w formie tabeli lub ilustracji (różnicowa częstotliwość lub procent sumy w oparciu o logarytm M). Na wizerunku graficznym jedna dekada masy cząsteczkowej powinna mieć normalnie około 4 cm szerokości, a maksymalna wartość szczytowa około 8 cm wysokości. W przypadku krzywych całkowego rozkładu różnica w rzędnych między 0 a 100 % powinna wynosić około 10 cm.

2.2. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

2.2.1. **Substancja badana:**

— dostępne informacje dotyczące badanej substancji (tożsamość, dodatki, zanieczyszczenia),

— opis przetwarzania próbki, uwagi, problemy.

2.2.2. **Oprzyrządowanie:**

— zbiornik z eluentem, obojętny gaz, odgazowywanie eluentu, skład eluentu, zanieczyszczenia,

— pompa, pulsowy tłumik, system wtryskowy,

— kolumny rozdzielające (wytwórca, wszystkie informacje dotyczące właściwości kolumn, takie jak rozmiar poru, rodzaj rozdzielającego materiału itd., liczba, długość oraz kolejność użytych kolumn),

— liczba półek teoretycznych kolumny (lub połączonych), wydajność rozdzielania, (rozdzielczość systemu),

— informacja dotycząca symetrii pików,

— temperatura kolumny, rodzaj sterowania temperaturą,

— detektor (zasada pomiarów, rodzaj, objętość kuwetowa),

— przepływomierz w przypadkach, gdy jest używany (wytwórca, zasada pomiarów),

— system umożliwiający rejestrację i przetwarzanie danych (osprzęt i oprogramowanie).

2.2.3. **Kalibracja systemu**

— szczegółowy opis metody używanej do przygotowania krzywej kalibracji,

▼B

— informacja dotycząca kryteriów jakościowych dla niniejszej metody (np. współczynnik korelacji, błąd sumy kwadratów itd.),

— informacja dotycząca ekstrapolacji, założenia i przybliżenia poczynione w trakcie procedury doświadczalnej oraz oszacowanie i przetwarzanie danych,

— wszystkie pomiary przeprowadzone w celu przygotowania krzywej kalibracji powinny być udokumentowane w tabelach, które zawierają następujące informacje dla każdego punktu kalibracji:

  — nazwa próbki,

  — producent próbki,

  — właściwości wartości wzorców M_p, M_n, M_w oraz M_w/M_n, jak przewidziano przez wytwórcę lub uzyskane na podstawie kolejnych pomiarów, razem ze szczegółami dotyczącymi metody wyznaczania,

  — objętość wtrysku oraz stężenie wtrysku,

  — wartość M_p używanej dla kalibracji,

  — objętość eluencyjna lub poprawiony czas retencji, mierzony przy maksimach piku,

  — M_p obliczone przy maksimum piku,

  — błąd procentowy wyliczonej M_p oraz wartość kalibracji.

2.2.4. **Informacja dotycząca zawartości polimerów o niskiej masie cząsteczkowej:**

— opis metod stosowanych w analizach i sposobie, w jaki przeprowadzone zostały doświadczenia,

— informacja dotycząca zawartości procentowej frakcji o małej masie cząsteczkowej w odniesieniu do masy całkowitej próbki,

— informacja dotycząca zanieczyszczeń, dodatków i innych niepolimerowych składnikach w procentach w odniesieniu do masy całkowitej próbki.

2.2.5. **Ocena:**

— ocena na podstawie czasu: wszystkie metody mające na celu zapewnienie wymaganej odtwarzalności (metoda poprawiania, wzorce wewnętrzne itd.),

— informacja dotycząca tego, czy ocena została przeprowadzona na podstawie objętości eluencyjnej lub czasu retencji,

— informacja dotycząca ograniczeń oceny, jeżeli pik nie został poddany analizie w całości,

— opis metod wygładzających, jeżeli są wykorzystywane,

— procedury przygotowawcze oraz wstępnego przetworzenia próbki,

— obecność nierozpuszczalnych cząstek, jeżeli istnieją,

▼B

— objętość wtrysku (µl) oraz stężenie wtrysku (mg/ml),

— uwagi wskazujące skutki, które prowadzą do odchyleń od idealnego profilu GPC,

— szczegółowy opis wszystkich zmian w procedurach badawczych,

— szczegóły dotyczące zakresów błędów,

— wszystkie inne informacje oraz uwagi istotne w odniesieniu do interpretacji wyników.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(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

Załącznik

Wytyczne dotyczące korygowania zawartości związków o niskiej masie cząsteczkowej w odniesieniu do obecności nierozpuszczalnych polimerów

Jeśli w próbce obecny jest nierozpuszczalny polimer, skutkiem tego jest utrata masy podczas analizy GPC. Nierozpuszczalny polimer pozostaje nieodwracalnie w kolumnie lub na filtrze próbkowym, podczas gdy rozpuszczalna część próbki przechodzi przez kolumnę. W przypadku gdy inkrement współczynnika załamania światła (dn/dc) polimeru może zostać oszacowany lub zmierzony, można oszacować utratę masy próbki na kolumnie. W takim przypadku przeprowadza się korektę, wykorzystując zewnętrzną kalibrację wzorcowymi materiałami o znanym stężeniu oraz dn/dc w celu kalibracji reakcji refraktometru. W poniższym przykładzie wykorzystywany jest wzorzec metaakrylanu polimetylu (pMMA).

W zewnętrznej kalibracji, w celu analizy akrylowych polimerów, wzorzec pMMA, o znanym stężeniu w tetrahydrofuranie, jest analizowany przez GPC, a otrzymane dane są wykorzystywane w celu znalezienia stałej refraktometru zgodnie ze wzorem:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

gdzie:

K = stała refraktometru (w mikrowoltosekundach/ml),

R = wskaźnik wzorca pMMA (w mikrowoltosekundach),

C = stężenie wzorca pMMA (w mg/ml),

V = objętość dozowana (w ml), oraz

dn/dc = inkrement współczynnika załamania światła dla pMMA w tetrahydrofuranie (w ml/mg)

Następujące dane są typowe dla wzorca pMMA:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Uzyskana wartość K, $3{,}05 \times 10^{11}$, jest następnie wykorzystywana w celu obliczania teoretycznej reakcji detektora, jeżeli 100 % wtryśniętego polimeru eluowało przez detektor.

▼B

A.20. **ZACHOWANIE POLIMERÓW W WODZIE – ROZPUSZCZANIE/EKSTRAKCJA**

1. **METODA**

Opisana metoda jest powtórzeniem wersji poprawionej OECD WT 120 (1997). Dalsze informacje techniczne podane są w pozycji bibliograficznej (1).

1.1. WPROWADZENIE

W odniesieniu do niektórych polimerów, takich jak np. polimerów emulsyjnych, zanim można zastosować metodę opisaną poniżej, konieczne mogą być wstępne prace przygotowawcze. Metoda ta nie ma zastosowania do polimerów płynnych oraz do polimerów, które reagują z woda w warunkach badania.

Jeżeli metoda nie jest praktyczna lub nie jest możliwe jej zastosowanie, zachowanie rozpuszczanie/ekstrakcja może zostać zbadane za pomocą innych metod. W takich przypadkach należy podać pełne szczegóły oraz uzasadnienie dla zastosowania metody.

1.2. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.3. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Zachowanie polimerów rozpuszczanie/ekstrakcja w środowisku wodnym ustalane jest przy wykorzystaniu metody kolbowej (zob. A.6. Rozpuszczalność w wodzie, metoda kolbowa) ze zmianami opisanymi poniżej.

1.4. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

Brak.

1.5. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.5.1. **Sprzęt**

W odniesieniu do tej metody wymagany jest następujący sprzęt:

— przyrząd zgniatający, np. młyn do wytwarzania cząstek o znanym rozmiarze,

— aparatura do wstrząsania z możliwością kontroli temperatury,

— system filtrowania membranowego,

— właściwy sprzęt analityczny,

— znormalizowane sita.

1.5.2. **Przygotowanie próbki**

Próbka reprezentatywna musi zostać najpierw zmniejszona do wielkości cząsteczek między 0,125 i 0,25 mm, wykorzystując właściwe sita. W odniesieniu do stabilności próbki lub w odniesieniu do procesu mielenia wymagane może być chłodzenie. Materiały o właściwościach podobnych do gumy mogą być kruszone w temperaturze ciekłego azotu (1).

Jeżeli wymagana frakcja wielkości cząsteczki jest nieosiągalna, powinno zostać podjęte działanie w celu zmniejszenia wielkości cząsteczek do najmniejszej możliwej wielkości oraz złożone sprawozdanie o wyniku. W sprawozdaniu niezbędne jest wskazanie sposobu, w jaki skruszona próbka była składowana przed badaniem.

▼B

1.5.3. **Procedura**

Trzy próbki o masie 10 g są odważane do trzech naczyń wyposażonych w szklane korki i dodaje się po 1 000 ml wody do każdego z naczyń. Jeżeli zastosowanie ilości 10 g polimeru okazuje się niewykonalne, powinna zostać wykorzystana największa najbliższa tej wartości ilość, jaką można zastosować, a objętość wody powinna zostać odpowiednio dostosowana.

Naczynia są szczelnie zamykane korkiem, a następnie wstrząsane w temperaturze 20 °C. Powinno zostać wykorzystane urządzenie wstrząsające lub mieszające, działające w stałej temperaturze. Po okresie 24 godzin zawartość każdego naczynia jest odwirowywana lub filtrowana, a stężenie polimeru w czystej fazie wodnej ustalane jest za pomocą odpowiedniej metody. Jeżeli odpowiednie metody analityczne w odniesieniu do fazy wodnej nie są dostępne, całkowitą rozpuszczalność/podatność na ekstrakcję można oszacować z suchej masy pozostałości filtracyjnej lub z odwirowanego strątu.

Zazwyczaj niezbędne jest ilościowe zróżnicowanie między zanieczyszczeniami i dodatkami, z jednej strony, oraz odmianami o małej masie cząsteczkowej, z drugiej strony. W przypadku oznaczania grawimetrycznego ważne jest także przeprowadzenie próby ślepej bez wykorzystania substancji badanej, w celu uwzględnienia pozostałości powstających w wyniku metody doświadczalnej.

Zachowanie polimerów rozpuszczanie/ekstrakcja w wodzie w temperaturze 37 °C przy pH 2 i pH 9 może zostać ustalone w ten sam sposób, jak opisano w odniesieniu do przeprowadzania doświadczenia w temperaturze 20 °C. Wartości pH można osiągnąć przez dodanie albo odpowiednich roztworów buforowych, albo odpowiednich kwasów lub zasad, takich jak kwas solny, kwas octowy, wodorotlenek sodu lub potasu o czystości analitycznej lub NH_3.

W zależności od wykorzystanej metody analizy, należy przeprowadzić jedno lub dwa badania. Jeżeli dostępne są wystarczająco szczegółowe metody w odniesieniu do bezpośredniej analizy fazy wodnej dla komponentu polimerowego, wystarczy przeprowadzić jedno badanie, jak opisano powyżej. Jednakże jeżeli takie metody nie są dostępne, a określenie zachowania rozpuszczania/ekstrakcji polimeru jest ograniczone do analizy pośredniej przez ustalanie tylko całkowitej zawartości węgla organicznego (TOC) ekstraktu wodnego, powinno zostać przeprowadzone dodatkowe badanie. Takie dodatkowe badanie należy także przeprowadzić trzykrotnie, stosując dziesięciokrotnie mniejsze próbki polimeru oraz takie same ilości wody jak ilości wykorzystane w pierwszym badaniu.

1.5.4. **Analiza**

1.5.4.1. *Badanie przeprowadzane z próbką jednego rozmiaru*

Mogą być dostępne metody analizy bezpośredniej komponentów polimerowych w fazie wodnej. Alternatywnie można rozważyć pośrednią analizę rozpuszczonych/ekstrahowanych komponentów polimerowych przez określenie całkowitej zawartości części rozpuszczalnych i korektę w odniesieniu do komponentów, które nie są właściwe dla polimerów.

Możliwa jest analiza fazy wodnej dla ogółu odmian polimerowych:

albo przez wystarczającą czułą metodę, np.:

— TOC, wykorzystującą ekstrahowanie na ciepło nadsiarczanu lub dwuchromianu, w celu otrzymania CO_2, a następnie wykonanie oznaczenia za pomocą podczerwieni IR lub analizy chemicznej,

▼B

— spektometrie absorpcji atomowej (AAS) lub jej równoważnik emisji indukcyjnie wzbudzonej plazmy (ICP) dla krzemu lub polimerów zawierających metale,

— pochłanianie UV lub spektrofluorometrie dla polimerów arylu,

— LC-MS dla próbek o małej masie cząsteczkowej,

lub przez odparowywanie w warunkach próżniowych do sucha ekstraktu wodnego i analizę spektroskopową (IR, UV itd.) lub analizę AAS/ICP pozostałości.

Jeżeli niemożliwa jest analiza samej fazy wodnej, roztwór wodny należy ekstrahować za pomocą organicznego rozpuszczalnika niemieszającego się z woda, np. chlorowanego węglowodoru. Rozpuszczalnik jest następnie odparowywany, a pozostałość analizowana pod kątem podanej zawartości polimeru w sposób określony powyżej. Wszelkie komponenty w tej pozostałości, które są identyfikowane jako zanieczyszczenia lub dodatki, mają zostać odjęte w celu określenia stopnia rozpuszczenia/ekstrakcji samego polimeru.

Jeżeli obecne są względnie duże ilości takich substancji, może wystąpić konieczność poddania pozostałości np. analizie HPLC lub GC, w celu odróżnienia zanieczyszczeń od obecnego monomeru i frakcji pochodnych monomeru, tak aby można było ustalić ich rzeczywistą zawartość.

W niektórych przypadkach wystarczające może być zwykłe odparowanie organicznego rozpuszczalnika do sucha i zważenie suchej pozostałości.

1.5.4.2. *Badanie przeprowadzane z dwoma próbkami o różnych rozmiarach cząsteczek*

Wszystkie ekstrakty wodne analizuje w odniesieniu do TOC.

Oznaczanie grawimetryczne przeprowadzane jest na nierozpuszczonej/niewyekstrahowanej części próbki. Jeżeli po odwirowaniu lub filtrowaniu zawartości każdego z naczyń pozostałości polimerów pozostają przytwierdzone do ścianek naczynia, naczynie powinno zostać przepłukane filtratem do momentu oczyszczenia naczynia ze wszystkich widocznych pozostałości. Następnie filtrat ponownie jest ponownie odwirowywany oraz filtrowany. Pozostałości na filtrze lub w rurze wirnikowej są suszone w temperaturze 40 ^{o}C w próżni oraz ważone. Suszenie kontynuuje się do momentu osiągnięcia stałej wagi.

2. **DANE**

2.1. BADANIE PRZEPROWADZANE Z PRÓBKĄ JEDNEGO ROZMIARU CZĄSTEK

Powinny zostać podane poszczególne wyniki dla każdej z trzech kolb oraz wartości średnie, wyrażone jednostkach masy na objętość roztworu (zwykle mg/l) lub masy na masę próbki polimeru (zwykle mg/g). Dodatkowo powinna zostać również podana utrata wagi próbki (obliczona jako masa substancji rozpuszczonej podzielona przez masę pierwszej próbki). Błędy względne powinny zostać odliczone (RSD). Dla całej substancji (polimer + niezbędne substancje dodane itd.) oraz dla samego polimeru (tj. po odjęciu substancji dodanych) należy podąć oddzielne dane liczbowe.

▼B

2.2. BADANIE PRZEPROWADZANE Z DWOMA PRÓBKAMI O RÓŻNYCH ROZMIARACH CZĄSTECZKI

Powinny zostać podane poszczególne wartości TOC ekstraktów wodnych dwóch trzykrotnie przeprowadzanych doświadczeń oraz średnich wartość dla każdego doświadczenia, wyrażone w jednostkach masy na objętość roztworu (zwykle mg/l) oraz w jednostkach masy na wagę pierwszej próbki (zwykle mgC/g).

Jeżeli nie istnieje różnica między wynikami w wysokich oraz niskich współczynnikach proporcji próbka/woda, może to wskazywać na to, że wszystkie możliwe do wyekstrahowania komponenty zostały faktycznie wyekstrahowane. W takim przypadku analiza bezpośrednia zazwyczaj nie byłaby konieczna. Powinny zostać podane masy poszczególnych pozostałości, wyrażone jako udział początkowych mas próbek.

Dla każdego eksperymentu powinny zostać obliczone wartości średnie. Różnice pomiędzy wartością 100 i otrzymanymi procentami wyrażają procenty materiału rozpuszczonego i ekstrahowanego w pierwotnej próbce.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDAŃ**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

3.1.1. **Substancja badana:**

— dostępne informacje dotyczące substancji badanej (tożsamość, substancje dodane, zanieczyszczenia, zawartość odmian o małej masie cząsteczkowej).

3.1.2. **Warunki przeprowadzania doświadczenia**

— opis wykorzystanych procedur i warunków przeprowadzania doświadczenia,

— opis metod analizy i wykrywania.

3.1.3. **Wyniki:**

— wyniki rozpuszczalności/podatności na ekstrakcję w mg/l; wartości poszczególne i średnie dla badań ekstrakcji w poszczególnych roztworach rozbite na zawartość polimerów oraz zanieczyszczeń, dodatki itd.,

— wyniki rozpuszczalności/podatności na ekstrakcję w mg/g polimeru,

— wartości TOC ekstraktów wodnych, masa substancji rozpuszczonej oraz udziały procentowe jeżeli zostały zmierzone,

— pH każdej próbki,

— informacje dotyczące wartości ślepej próby,

— w miarę potrzeb odniesienia do niestabilności chemicznej substancji badanej, zarówno podczas procesu badania, jak i podczas procesu analitycznego,

— wszystkie informacje które są ważne w odniesieniu do interpretacji wyników.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen fur Prufzwecke.

▼B

A.21. **WŁAŚCIWOŚCI UTLENIAJĄCE (CIECZE)**

1. **METODA**

1.1. WPROWADZENIE

Ta metoda badawcza jest przeznaczona do pomiaru potencjału substancji ciekłej do zwiększenia szybkości spalania oraz intensywności spalania materiałów palnych lub do tworzenia mieszanin z materiałami palnymi, które spontanicznie zapalają się, kiedy są ze sobą dokładnie wymieszane. Jest oparta na badaniu ONZ dla cieczy utleniających (1) i jest z nim równoważna, jakkolwiek metoda A.21 jest przede wszystkim zaprojektowana, aby spełniać wymagania rozporządzenia 1907/2006, gdzie wymagane jest porównanie tylko z jedną substancją odniesienia. Konieczne może być badanie i porównanie z dodatkowymi substancjami odniesienia, gdyby wyniki badań miały być wykorzystywane do innych celów ([1]).

To badanie nie musi być przeprowadzone, jeżeli badanie wzoru strukturalnego wyjaśnia ponad wszelką zasadną wątpliwość, że ta substancja nie jest zdolna do reakcji egzotermicznej z materiałem palnym.

Przed przeprowadzeniem tego badania przydatne jest posiadanie wstępnych informacji na temat jakichkolwiek potencjalnych właściwości wybuchowych substancji.

Badanie to nie ma zastosowania do ciał stałych, gazów, substancji wybuchowych lub łatwopalnych bądź nadtlenków organicznych.

Można nie przeprowadzać tego badania, jeżeli są już dostępne dla substancji badanej wyniki próby ONZ dla cieczy utleniających (1).

1.2. DEFINICJE IJEDNOSTKI

Średni czas wzrostu ciśnienia jest wartością średnią mierzonych czasów, w jakich badana mieszanina spowoduje wzrost ciśnienia z 690 kPa do 2 070 kPa powyżej ciśnienia atmosferycznego.

1.3. SUBSTANCJAODNIESIENIA

Jako substancja odniesienia wymagany jest 65 % (m/m) roztwór wodny kwasu azotowego (czysty do analizy) ([2]).

([1]) Jak na przykład w ramach przepisów transportowych ONZ.
([2]) Kwas powinien być miareczkowany przed badaniem, aby potwierdzić jego stężenie.

▼B

Ewentualnie, jeżeli osoba badająca przewiduje, że wyniki tego badania będą mogły ostatecznie zostać użyte do innych celów, może być również właściwe badanie dodatkowych substancji odniesienia ([1]).

1.4. ZASADY METODY BADAWCZEJ

Badana ciecz jest mieszana w stosunku wagowym 1 do 1 z celulozą włóknistą i wprowadzana do komory ciśnieniowej. Jeżeli podczas mieszania lub napełniania następuje spontaniczny zapłon, nie są konieczne dalsze badania.

Jeżeli nie następuje spontaniczny zapłon, przeprowadza się pełne badanie. Mieszanina jest ogrzewana w komorze ciśnieniowej i mierzony jest średni czas potrzebny do podniesienia ciśnienia od 690 kPa do 2 070 kPa powyżej ciśnienia atmosferycznego. Otrzymana wartość jest porównywana ze średnim czasem wzrostu ciśnienia dla mieszaniny substancji odniesienia i celulozy w stosunku 1:1.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

W serii pięciu prób przeprowadzonych na pojedynczej substancji żaden wynik nie powinien odbiegać od średniej arytmetycznej o więcej niż 30 %. Wyniki różniące się od średniej o więcej niż 30 % powinny zostać odrzucone, procedura mieszania i napełniania powinna zostać poprawiona, a badanie powtórzone.

1.6. OPIS METODY

1.6.1. **Przygotowanie**

1.6.1.1. *Substancja palna*

Jako materiał palny jest używana sucha, włóknista celuloza o długości włókna od 50 do 250 μm i średniej średnicy równej 25 μm ([2]). Jest suszona do stałej masy, w warstwie o grubości nieprzekraczającej 25 mm w temperaturze 105 °C przez 4 godziny i trzymana w suszarce, ze środkiem suszącym, aż do ochłodzenia i do momentu, gdy będzie potrzebna do użycia. Zawartość wody w suchej celulozie powinna być mniejsza niż 0,5 % suchej masy ([3]). W razie potrzeby należy przedłużyć czas suszenia aż do osiągnięcia tego stanu ([4]). W całym badaniu musi być używana ta sama partia celulozy.

([1]) Np. 50 % (m/m) kwasu chlorowego (VII) i 40 % (m/m) chlorku sodowego stosuje się w pozycji bibliograficznej (1).

([2]) Np. proszek celulozowy do kolumn chromatograficznych Whatmana CF 11, nr katalogowy 4021 050.

([3]) Potwierdzone przez np. miareczkowanie metodą Karla-Fishera.

([4]) Alternatywnie, tę zawartość wody można również osiągnąć przez np. ogrzewanie w 105 °C w próżni przez 24 godz.

▼B

1.6.1.2. *Aparatura*

1.6.1.2.1. Komora ciśnieniowa

Potrzebna jest komora ciśnieniowa. Komora ta składa się z cylindrycznego, stalowego zbiornika ciśnieniowego o długości 89 mm i średnicy zewnętrznej 60 mm (zob. rysunek 1). Po przeciwległych stronach cylindra są ścięte dwie płaszczyzny (zmniejszające przekrój poprzeczny komory do 50 mm), aby ułatwić trzymanie podczas montażu zapłonnika i wkładki odpowietrzającej. Komora, która ma otwór o średnicy 20 mm, jest od wewnątrz na obu końcach rozwiercona do głębokości 19 mm oraz nagwintowana, tak aby można było wkręcić w nią rurę o średnicy 1" według norm British Standard Pipe (BSP) lub odpowiednik według układu metrycznego. Urządzenie do pomiaru ciśnienia, w postaci ramienia bocznego, jest przykręcone do zakrzywionej powierzchni zewnętrznej komory ciśnieniowej w odległości 35 mm od jednego końca, pod kątem 90° do ściętej płaszczyzny. Gniazdo dla niego jest nawiercone na głębokość 12 mm i nagwintowane, tak aby można było wkręcić w nie gwint o średnicy 1/2" według BSP (lub odpowiednik według układu metrycznego), znajdujący się na końcu ramienia bocznego. W razie potrzeby stosuje się obojętną uszczelkę w celu zapewnienia gazoszczelności. Ramię boczne wystaje na 55 mm poza korpus komory ciśnieniowej i ma wywiercony otwór o średnicy 6 mm. Koniec ramienia bocznego jest rozwiercony i nagwintowany, tak aby można było osadzić manometr przeponowy. Może być stosowane dowolne urządzenie do pomiaru ciśnienia, pod warunkiem że będzie odporne na działanie gorących gazów lub produktów rozkładu i będzie zdolne reagować na zmiany wzrostu ciśnienia w zakresie 690–2 070 kPa w czasie nie dłuższym niż 5 ms.

Koniec komory ciśnieniowej najbardziej oddalony od ramienia bocznego jest zamknięty zapłonnikiem, który jest wyposażony w dwie elektrody, jedną izolowaną, a drugą uziemioną do jego korpusu. Drugi koniec komory ciśnieniowej jest zamknięty membraną bezpieczeństwa (ciśnienie uderzeniowe wynosi około 2 200 kPa) utrzymywaną w swojej pozycji przy pomocy wkładki ustalającej, która ma otwór o średnicy 20 mm. W razie potrzeby, w celu zapewnienia dopasowania gazoszczelnego, przy zapłonniku stosowana jest uszczelka obojętna. Stojak (rysunek 2) utrzymuje zestaw podczas użytkowania na odpowiedniej wysokości. Składa się on zwykle z płytki podstawy, wykonanej z miękkiej stali, o wymiarach 235 mm × 184 mm × 6 mm i z profilu kwadratowego o długości 185 mm i wymiarach 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Z każdego z przeciwległych boków na jednym końcu na długości profilu kwadratowego wycięto fragment, tak że powstała konstrukcja mająca dwie nóżki o płaskich ściankach, na której jest nienaruszony przekrój skrzynkowy o długości 86 mm. Końce tych płaskich ścianek są przycięte pod kątem 60° do poziomu i przyspawane do płytki podstawy. W jednym boku górnego końca głównego profilu wycięto szczelinę o szerokości 22 mm i głębokości 46 mm, żeby podczas wkładania zestawu komory ciśnieniowej, najpierw koniec z zapłonnikiem, do uchwytu z przekroju skrzynkowego ramię boczne mieściło się w szczelinie. Kawałek stali o szerokości 30 mm i grubości 6 mm jest przyspawany do dolnej wewnętrznej ścianki przekroju skrzynkowego i działa jako rozpórka. Dwie śruby skrzydełkowe o średnicy 7 mm, przykręcone do przeciwległej ścianki, służą do trzymania komory ciśnieniowej mocno na miejscu. Dwa paski o szerokości 12 mm ze stali o grubości 6 mm, przyspawane do części bocznych, przylegając do podstawy przekroju skrzynkowego, podpierają komorę ciśnieniową od dołu.

▼B

1.6.1.2.2. System zapłonu

System zapłonu składa się drutu Ni/Cr o długości 25 cm o średnicy 0,6 mm i oporze 3,85 om/m. Drut jest zwinięty, przy pomocy pręta o średnicy 5 mm, w kształt cewki i podłączony do elektrod zapłonnika. Cewka powinna mieć jedną z konfiguracji przedstawionych na rysunku 3. Odstęp pomiędzy dnem komory a spodem cewki zapłonowej powinien wynosić 20 mm. Jeżeli elektrody nie są nastawne, końce przewodu zapłonowego pomiędzy cewką a dnem komory powinny być izolowane osłoną ceramiczną. Przewód jest ogrzewany prądem stałym o natężeniu przynajmniej 10 A.

1.6.2. **Prowadzenie badania** ([1])

Aparatura, złożona w całości z przetwornikiem ciśnieniowym i systemem ogrzewania, ale bez założonej membrany bezpieczeństwa, jest trzymana końcem z zapłonnikiem na dół. 2,5 g cieczy przeznaczonej do badania jest mieszane z 2,5 g wysuszonej celulozy w zlewce szklanej przy pomocy szklanej bagietki ([2]). Dla bezpieczeństwa mieszanie powinno być prowadzone za osłoną bezpieczeństwa umieszczoną między operatorem a mieszaniną. Jeżeli mieszanina zapali się podczas mieszania lub napełniania, nie będą konieczne żadne dalsze badania. Mieszanina jest podawana do komory ciśnieniowej małymi porcjami z lekkim ubijaniem. Należy przy tym zapewnić, żeby była dobrze upakowana wokół cewki zapłonowej i żeby się z nią dobrze stykała. Ważne jest, żeby nie poruszyć cewki podczas procesu upakowywania, ponieważ może to prowadzić do błędnych wyników ([3]). Membrana bezpieczeństwa jest umieszczana na swoim miejscu, a nakrętka zabezpieczająca jest mocno przykręcana. Naładowana komora jest przenoszona membraną bezpieczeństwa do góry do stojaka, który powinien być umieszczony w odpowiednim, opancerzonym dygestorium lub komorze zapłonowej. Do zewnętrznych końcówek zapłonnika podłącza się zasilanie i podaje prąd o natężeniu 10 A. Czas od rozpoczęcia mieszania do włączenia zasilania nie powinien przekraczać 10 min.

Sygnał generowany przez przetwornik ciśnieniowy jest zapisywany przez odpowiedni system, który pozwala zarówno na ocenę, jak i tworzenie ciągłego zapisu profilu zmiany ciśnienia w czasie (np. przejściowy rejestrator podłączony do rejestratora graficznego). Mieszanina jest ogrzewana aż do przerwania membrany bezpieczeństwa lub do upływu 60 s. Jeżeli membrana bezpieczeństwa nie zostanie zerwana, należy pozwolić mieszaninie ostygnąć przed ostrożnym demontażem aparatury, podejmując środki bezpieczeństwa na wypadek wzrostu ciśnienia. Z substancją badaną i z substancją(-ami) odniesienia wykonuje się pięć prób. Zapisywany jest czas potrzebny na zwiększenie ciśnienia od 690 kPa do 2 070 kPa powyżej ciśnienia atmosferycznego. Obliczany jest średni czas wzrostu ciśnienia.

W niektórych przypadkach substancje mogą wytwarzać wzrost ciśnienia (zbyt duży lub zbyt mały) wskutek reakcji chemicznych niecharakteryzujących właściwości utleniających substancji. W tych przypadkach do wyjaśnienia przebiegu reakcji może być konieczne powtórzenie badania z substancją obojętną np. diatomitem (ziemia okrzemkowa) zamiast celulozy.

([1]) Mieszaniny utleniaczy z celulozą muszą być traktowane jako potencjalnie wybuchowe i należy z nimi postępować z należytą ostrożnością.

([2]) Można to osiągnąć w praktyce, przygotowując mieszaninę w stosunku 1:1 cieczy przeznaczonej do badania i celulozy z ilości większej, niż jest potrzebna, do próby i przenosząc 5 ± 0,1 g do komory ciśnieniowej. Mieszanina powinna być świeżo przygotowywana do każdej próby.

([3]) W szczególności należy unikać zetknięcia sąsiednich zwojów cewki.

▼B

2. **DANE**

Czasy wzrostu ciśnienia zarówno dla substancji badanej, jak i substancji odniesienia. Czasy wzrostu ciśnienia dla badań z substancją obojętną, jeżeli zostały przeprowadzone.

2.1. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Oblicza się średnie czasy wzrostu ciśnienia zarówno dla substancji badanej, jak i dla substancji odniesienia.

Oblicza się średni czas wzrostu ciśnienia dla badań z substancją obojętną (jeżeli przeprowadzono).

Przykładowe wyniki zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1

Przykładowe wyniki [a]

Substancja [b]	Średnia wartość wzrostu ciśnienia dla mieszaniny 1:1 z celulozą (ms)
Dwuchromian amonu; nasycony roztwór wodny	20 800
Azotan amonu, nasycony roztwór wodny	6 700
Azotan żelaza, nasycony roztwór wodny	4 133
Nadchloran litu, nasycony roztwór wodny	1 686
Nadchloran magnezu, nasycony roztwór wodny	777
Azotan niklu, nasycony roztwór wodny	6 250
Kwas azotowy, 65 %	4 767 [c]
Kwas nadchlorowy, 50 %	121 [c]
Kwas nadchlorowy, 55 %	59
Azotan potasu, 30 % roztwór wodny	26 690
Azotan srebra, nasycony roztwór wodny	[d]
Chloran sodu, 40 % roztwór wodny	2 555 [c]
Azotan sodu, 45 % roztwór wodny	4 133
Substancja obojętna	
Woda: celuloza	[d]

[a] Zob. poz. lit. (1) dla klasyfikacji według programu transportu ONZ.
[b] Roztwór nasycony powinien zostać przygotowany w 20 °C.
[c] Wartość średnia dla międzylaboratoryjnych prób porównawczych.
[d] Nie osiągnięto maksymalnego ciśnienia 2 070 kPa.

▼B

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań powinno zawierać następujące informacje:

— identyfikację, skład, stopień czystości itp. badanej substancji,

— stężenie badanej substancji,

— procedurę suszenia celulozy,

— zawartość wody w użytej celulozie,

— wyniki pomiarów,

— ewentualne wyniki badań z zastosowaniem substancji obojętnej,

— obliczone średnie czasy wzrostu ciśnienia,

— jakiekolwiek odchylenia od tej metody i ich przyczyny,

— wszystkie dodatkowe informacje lub uwagi istotne dla interpretacji wyników.

3.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW ([1])

Wyniki są oceniane na podstawie:

a)
czy mieszanina substancji badanej i celulozy zapala się spontanicznie; oraz

b)
porównania średniego czasu potrzebnego do wzrostu ciśnienia od 690 kPa do 2 070 kPa z tą samą wartością dla substancji odniesienia.

Ciecz jest uznawana za utleniacz, jeżeli:

a) mieszanina w stosunku wagowym 1:1 badanej substancji i celulozy zapala się spontanicznie; lub

b) mieszanina w stosunku wagowym 1:1 substancji badanej i celulozy wykazuje średni czas wzrostu ciśnienia niższy lub równy średniemu czasowi wzrostu ciśnienia mieszaniny 1:1, wagowo, dla 65 % (m/m) roztworu wodnego kwasu azotowego i celulozy.

Aby uniknąć fałszywych wyników pozytywnych, w razie potrzeby przy interpretacji wyników należy również uwzględnić wyniki otrzymane w badaniu substancji z materiałem obojętnym.

([1]) Zob. pozycja bibliograficzna (1) w celu interpretacji wyników według programu transportu ONZ.

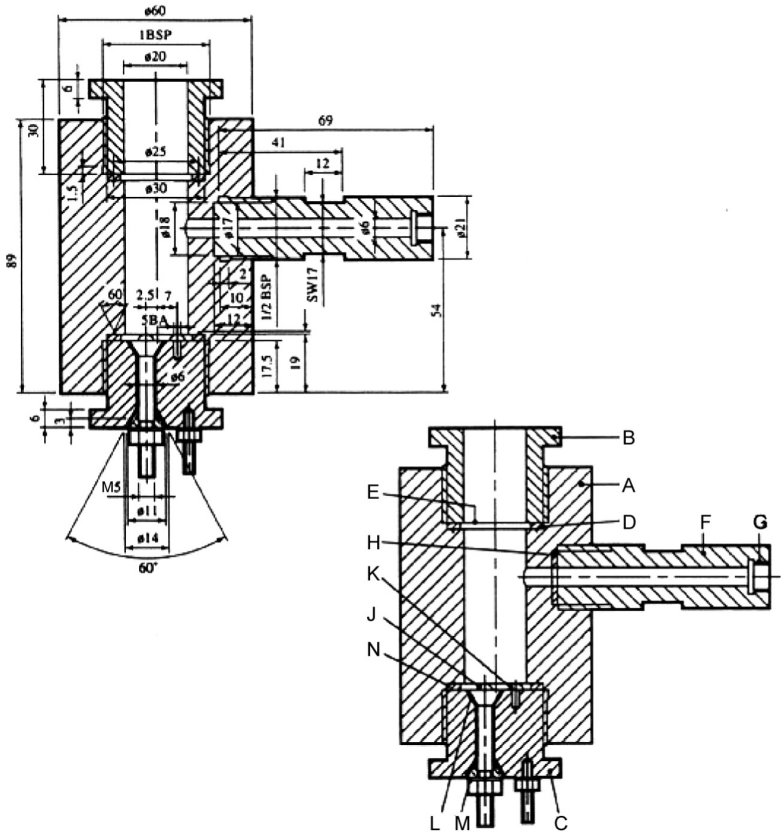
▼B

4. **BIBILIOGRAFIA**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. Publikacja ONZ Nr: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, s. 342. Badanie O.2: Badanie na utlenianie cieczy.

Rysunek 1

Komora ciśnieniowa



(A) Korpus komory ciśnieniowej

(B) Wkładka ustalająca membrany bezpieczeństwa

(C) Zapłonnik

(D) Miękka uszczelka ołowiana

(E) Membrana bezpieczeństwa

(F) Ramię boczne

(G) Głowica przetwornika ciśnieniowego

(H) Uszczelka

(J) Elektroda izolowana

(K) Elektroda uziemiona

(L) Izolacja

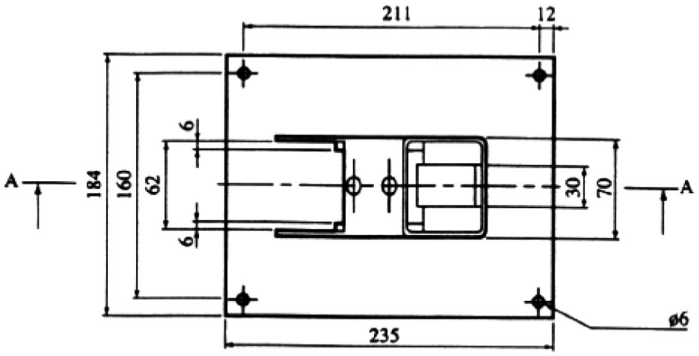
(M) Stożek stalowy

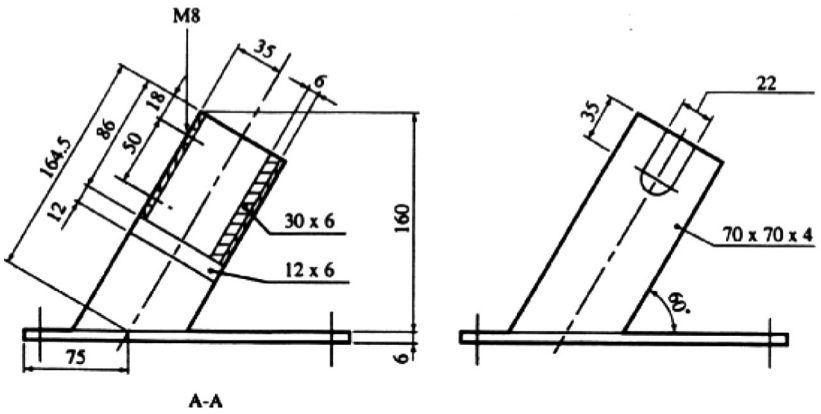
(N) Rowek odkształcający uszczelkę

▼B

Rysunek 2

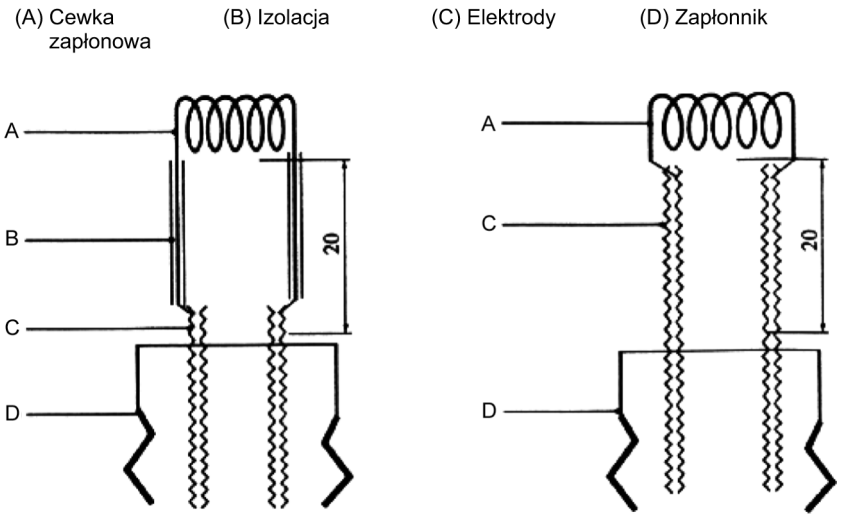
Stojak





Rysunek 3

Układ zapłonu



Uwaga: Może zostać użyta którakolwiek z tych konfiguracji.

▼M1

A.22. **WAŻONA DŁUGOŚCIĄ ŚREDNIA GEOMETRYCZNA ŚREDNICA WŁÓKIEN**

1. **METODA**

1.1. WSTĘP

W opisie metody przedstawiono procedurę stosowaną do określenia ważonej długością średniej geometrycznej średnicy włókna (LWGMD) sztucznych włókien mineralnych luzem (MMMF). Ponieważ LWGMD populacji z prawdopodobieństwem 95 % znajdzie się między dwoma 95 % poziomami ufności (LWGMD ± dwa błędy standardowe) próby, wartością przedstawianą (wartością testową) będzie niższy przedział ufności próby (tj. LWGMD — 2 błędy standardowe). Metoda opiera się na aktualizowanej (czerwiec 1994) wstępnej wersji procedury HSE w przemyśle, uzgodnionej na spotkaniu ECFIA z HSE w Chester 26.09.1993 i opracowanej dla i na podstawie wyników drugiego testu międzylaboratoryjnego (1, 2). Ta metoda pomiaru może być stosowana do charakteryzowania średnicy włókien substancji luzem lub produktów zawierających MMMF, w tym ogniotrwałych włókien ceramicznych (RCF), sztucznych włókien szklistych (MMVF), włókien krystalicznych i polikrystalicznych.

Ważenie długością jest sposobem kompensowania efektu rozkładu średnicy włókien, spowodowanego łamaniem się długich włókien w czasie pobierania próbek lub manipulowania materiałem. Do pomiaru rozkładu średnic MMMF stosuje się parametry statystyczne (średnia geometryczna), ponieważ średnice te mają zwykle rozkład wielkości zbliżony do lognormalnego.

Pomiar długości, a także średnicy, jest żmudny i czasochłonny, ale jeśli mierzone są tylko te włókna, które dotykają nieskończenie cienkiej linii w polu widzenia skaningowego mikroskopu elektronowego, to prawdopodobieństwo wybrania danego włókna jest proporcjonalne do jego długości. Ponieważ w obliczeniach ważonych długością uwzględniona jest długość, to jedyną wymaganą miarą jest średnica i LWGMD-2SE może być obliczana, jak opisano.

1.2. DEFINICJE

Cząstka: obiekt o stosunku długości do szerokości mniejszym niż 3:1.

Włókno: obiekt o stosunku długości do szerokości (wydłużenie) co najmniej 3:1.

1.3. ZAKRES I OGRANICZENIA

Metoda ta została opracowana w celu obserwacji rozkładu średnic, które charakteryzują się medianą od 0,5 μm do 6 μm. Większe średnice mogą być mierzone przy zastosowaniu mniejszego powiększenia mikroskopu, ale zastosowanie metody jest coraz bardziej ograniczone w miarę zmniejszania się włókien i dla mediany średnic poniżej 0,5 μm zaleca się stosowanie TEM (transmisyjny mikroskop elektronowy).

▼M1

1.4. ZASADA METODY TESTOWEJ

Z włókniny lub włókien luzem pobierana jest pewna liczna reprezentatywnych próbek rdzeniowych. W procedurze kruszenia zmniejsza się długość włókien luzem i reprezentatywna podpróbka jest rozprowadzana w wodzie. Alikwoty są ekstrahowane i filtrowane przez filtry poliwęglanowe o otworach 0,2 μm i przygotowywane do badań przy zastosowaniu techniki skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Średnice włókien są mierzone przy powiększeniu ×10 000 lub większym ([1]) przy zastosowaniu metody przecięcia linii, aby otrzymać nieprzekłamaną szacunkową wielkość średnicy. Obliczany jest niższy 95 % przedział ufności (na podstawie testu jednostronnego) w celu uzyskania szacunkowej najniższej wartości średniej geometrycznej średnicy włókien materiału.

1.5. OPIS METODY TESTOWEJ

1.5.1. **Bezpieczeństwo/środki ostrożności**

Należy ograniczać kontakt z zawieszonymi w powietrzu włóknami i przy manipulowaniu suchymi włóknami należy stosować wyciąg lub komorę rękawicową. Należy przeprowadzać okresowy monitoring ekspozycji w celu określenia skuteczności zastosowanych metod zabezpieczenia. Przy pracy z MMMF należy używać rękawic jednorazowych, aby zmniejszyć podrażnienie skóry i zapobiec skażeniu krzyżowemu.

1.5.2. **Aparatura/sprzęt**

— Prasa (o nacisku co najmniej 10 MPa) i formy,

— poliwęglanowy filtr o porach kapilarnych średnicy 0,2 μm (średnica filtra 25 mm),

— celulozowy filtr membranowy stosowany jako filtr wstępny,

— szklana aparatura filtracyjna (lub jednorazowe systemy filtracyjne) do umocowania filtrów (np. szklany zestaw do mikroanalizy Millipore, typ nr XX10 025 00),

— świeżo destylowana woda, która została przefiltrowana przez filtr o średnicy porów 0,2 μm w celu usunięcia mikroorganizmów,

— napylarka do napylania złotem lub złotem/palladem,

— skaningowy mikroskop elektronowy o rozdzielczości do 10 nm i mogący pracować przy powiększeniu × 10 000,

— dodatkowe: szpatułki, ostrza skalpeli typ 24, pincety, rurki SEM, klej węglowy lub węglowa taśma klejąca, srebro koloidalne,

— sonda ultradźwiękowa lub podręczna myjka ultradźwiękowa,

— urządzenie do pobierania próbek rdzeniowych lub korkociąg do pobierania próbek rdzeniowych z włókniny MMMF.

([1]) Ta skala powiększenia jest wskazana dla włókien 3 μm, dla włókien 6 μm właściwsze może być powiększenie × 5 000.

▼**M1**

1.5.3. **Procedura testowa**

1.5.3.1. *Pobieranie próbek*

W przypadku włókniny i płatów materiału do pobierania prób przekroju stosuje się 25 mm urządzenie do pobierania prób rdzeniowych lub korkociąg. Próbki powinny być pobierane z miejsc rozmieszczonych równomiernie na całej szerokości włókniny, jeśli ma ona niewielką długość lub miejsc losowych w przypadku długich płatów włókniny. Te same urządzenia mogą być używane do pobierania losowych próbek z włókien luzem. Jeśli to możliwe należy pobierać sześć próbek, aby uwzględnić zróżnicowanie przestrzenne materiału luzem.

Sześć próbek rdzeniowych należy pokruszyć w formie o średnicy 50 mm, stosując nacisk 10 MPa. Materiał mieszany jest szpatułką i powtórnie prasowany przy zastosowaniu nacisku 10 MPa. Materiał następnie wyjmuje się z formy i umieszcza w szczelnej szklanej butelce.

1.5.3.2. *Przygotowanie próby*

Jeśli to konieczne, można usunąć organiczny środek wiążący przez umieszczenie włókien na około 1 godzinę w piecu o temperaturze 450 °C.

Próby podzielić przez stożkowanie i ćwiartkowanie (należy to zrobić w komorze odpylającej).

Szpatułką dodać niewielką ilość (< 0,5 g) próbki do 100 ml świeżo destylowanej wody, która została przefiltrowana przez filtr membranowy 0,2 μm (można użyć alternatywnych źródeł ultraczystej wody, jeśli wykazano, że są zadowalającej jakości). Rozprowadzić dokładnie sondą ultradźwiękową przy mocy roboczej 100 W, ustawionej tak, aby zachodziła kawitacja. (Jeśli nie ma sondy zastosować następującą metodę: wytrząsać wielokrotnie i odwrócić na 30 sekund; umieścić w myjce ultradźwiękowej na pięć minut; następnie wielokrotnie wytrząsać i odwrócić ponownie na 30 sekund).

Natychmiast po rozproszeniu włókien pobrać kilka alikwot (np. trzy alikwoty 3, 6 i 10 ml) przy użyciu szerokiej pipety (pojemności 2–5 ml).

Każdą alikwotę przefiltrować próżniowo przez 0,2 μm filtr poliwęglanowy z dodatkowym filtrem wstępnym MEC o średnicy porów 5 μm, stosując 25 mm szklany lejek z cylindrycznym zbiornikiem. Do lejka należy wlać 5 ml przefiltrowanej wody destylowanej, a alikwotę należy wolno pipetować do wody, przy czym jej końcówka powinna znajdować się poniżej menisku. Po pipetowaniu należy dokładnie spłukać pipetę i zbiorniczek, ponieważ cienkie włókna często zalegają na powierzchni.

Uważnie wyjąć filtr i przed umieszczeniem w naczyniu do suszenia oddzielić go od dodatkowego filtra.

▼M1

Odciąć ćwiartkę lub połowę przekroju filtru przefiltrowanego osadu ostrzem skalpela typu 24, stosując ruch wahadłowy. Ostrożnie przymocować odcięty przekrój do stolika SEM, stosując klej węglowy lub węglową taśmę klejącą. Srebro koloidalne należy nałożyć przynajmniej w trzech miejscach, aby zapewnić lepszy kontakt elektryczny na krawędziach filtra i stolika. Po wyschnięciu kleju/srebra koloidalnego napylić ok. 50 nm warstwę złota lub złota/palladu na powierzchnię osadu.

1.5.3.3. *Kalibracja i obsługa SEM*

1.5.3.3.1. Kalibracja

Kalibracja SEM powinna być sprawdzana przynajmniej raz w tygodniu (najlepiej codziennie) przy użyciu certyfikowanej siatki kalibracyjnej. Kalibracja powinna być porównywana z certyfikowanym wzorcem i jeśli zmierzona wartość (SEM) nie mieści się w granicach ± 2 % wartości wzorcowej, należy przeprowadzić kalibrację SEM i powtórzyć kontrolę.

Mikroskop SEM powinien mieć rozdzielczość wystarczającą co najmniej do zidentyfikowania widzialnej średnicy 0,2 μm przy użyciu prawdziwego materiału próbki przy powiększeniu × 2 000.

1.5.3.3.2. Obsługa

SEM powinien działać przy powiększeniu 10 000 razy ([1]) w warunkach, które zapewniają dobrą rozdzielczość, przy możliwej do przyjęcia jakości obrazu i przy niskiej prędkości skanowania, na przykład 5 sekund na obraz. Wprawdzie wymagania operacyjne mogą się różnić w przypadku poszczególnych SEM, ale generalnie, aby otrzymać najlepszą widzialność i rozdzielczość z materiałami o stosunkowo niskiej masie atomowej powinno się stosować napięcia przyspieszające 5–10 keV, przy stosunkowo małej średnicy plamki i niewielkiej odległości roboczej. Ponieważ przeprowadzane jest przesuwanie liniowe, należy zastosować pochylenie 0°, aby zminimalizować konieczność ponownego ustawienia ogniskowej lub, jeśli SEM wyposażony jest w stolik eucentryczny, należy zastosować eucentryczną odległość roboczą. Mniejsze powiększenia można stosować, jeśli materiał nie zawiera małych (pod względem średnicy) włókien i wszystkie średnice włókien są > 5 μm.

1.5.3.4. *Rozmiary*

1.5.3.4.1. Badanie przy małym powiększeniu, aby ocenić próbkę

Najpierw należy obejrzeć próbkę przy małym powiększeniu, aby sprawdzić, czy występują skupienia dużych włókien i ocenić gęstość włókien. W przypadku nadmiernej grudkowatości zaleca się przygotowanie nowej próbki.

Aby zapewnić statystyczną dokładność konieczne jest zmierzenie minimalnej liczby włókien, a wysoka gęstość włókien może zostać uznana za przydatną właściwość, ponieważ badanie pustych pól jest czasochłonne i niewiele wnosi do analizy. Jeśli jednak filtr jest przeładowany, dokonanie pomiaru wszystkich możliwych do zmierzenia włókien staje się trudne, a ponieważ małe włókna mogą być zasłaniane przez większe, można je przeoczyć.

([1]) W przypadku włókien 3 μm zob. poprzedni przypis.

▼**M1**

Tendencja do popełniania błędu przeszacowania LWGMD może wynikać z gęstości włókien powyżej 150 włókien na milimetr liniowego przesunięcia. Z drugiej strony niskie zagęszczenie włókien wydłuża czas analizy i często przygotowanie próbki z zagęszczeniem włókien bliższym optimum jest bardziej ekonomiczne niż poleganie na zliczeniach na filtrach o niskim zagęszczeniu. Przy optymalnym zagęszczeniu, na pole widzenia przy powiększeniu 5 000 razy powinno przypadać średnio jedno lub dwa policzalne włókna. Optymalne zagęszczenie zależy jednak od wielkości (średnicy) włókien, tak więc konieczne jest, aby operator korzystał ze specjalistycznych ocen, które pozwolą mu stwierdzić czy zagęszczenie włókien jest bliskie optymalnemu czy nie.

1.5.3.4.2. Ważenie długością średnic włókien

Liczone są tylko te włókna, które dotykają (lub przecinają) (nieskończenie) cienkiej linii na ekranie SEM. Z tego powodu przez środek ekranu przebiega pozioma (lub pionowa) linia.

Alternatywną możliwością jest umieszczenie jednego punktu na środku ekranu i stałe skanowanie przez filtr w jednym kierunku. Średnica każdego włókna o współczynniku smukłości większym niż 3:1 i dotykającym tego punktu lub go przecinającym jest mierzona, a wyniki są rejestrowane.

1.5.3.4.3. Wyznaczanie wielkości włókien

Zaleca się, aby zmierzyć co najmniej 300 włókien. Każde włókno mierzone jest tylko raz w punkcie przecięcia z linią lub punktem narysowanym na obrazie (lub blisko punktu przecięcia, jeśli brzegi włókna są niewyraźne). Jeśli napotyka się włókna o niejednorodnym przekroju, należy stosować miarę mówiącą o średniej średnicy włókna. Należy zachować ostrożność przy wyznaczaniu krawędzi i mierzeniu najmniejszej odległości między brzegami włókien. Pomiary mogą być przeprowadzane *on-line* lub *off-line* na zapisanych obrazach lub fotografiach. Zaleca się stosowanie półautomatycznych systemów pomiarów obrazu, które ładują dane bezpośrednio do arkusza kalkulacyjnego, ponieważ oszczędzają one czas, eliminują błędy transkrypcji, a obliczenia mogą być zautomatyzowane.

Końce długich włókien powinny być sprawdzane przy małych powiększeniach, aby upewnić się, że włókna te nie zwijają się z powrotem, nie wracają do pola widzenia i że są mierzone tylko raz.

2. **DANE**

2.1. POSTĘPOWANIE Z WYNIKAMI

Zwykle średnice włókien nie odbiegają od rozkładu normalnego. Dokonując jednak przekształcenia logarytmicznego, możliwe jest uzyskanie rozkładu, który w przybliżeniu odpowiada normalnemu.

Obliczyć średnią arytmetyczną (średnia lnD) i odchylenie standardowe (SD_{lnD}) wartości logarytmu logarytmu naturalnego (lnD) średnic n włókien (D).

$$\text{średnia lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{n} \quad (1)$$

▼M1

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{średnia } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Odchylenie standardowe dzieli się przez pierwiastek kwadratowy liczby pomiarów (n) w celu obliczenia błędu standardowego (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Odjąć dwa błędy standardowe od średniej i obliczyć wykładnik dla tej wartości (średnia minus dwa błędy standardowe), aby otrzymać średnią geometryczną minus dwa błędy standardowe.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{średnia } lnD - 2SE_{lnD})} \quad (4)$$

3. **RAPORTOWANIE**

RAPORT Z TESTU

Raport z przeprowadzonego testu musi zawierać przynajmniej następujące informacje:

— wartość LWGMD-2SE,

— wszelkie odstępstwa od procedury, a w szczególności te, które mogą mieć wpływ na precyzję lub dokładność wyników, z odpowiednimi wyjaśnieniami.

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-weighted 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. WSPÓŁCZYNNIK PODZIAŁU (1-OKTANOL/WODA): METODA POWOLNEGO MIESZANIA

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 123 (2006). Wartości współczynnika podziału 1-oktanol/woda (P_{OW}) aż do log P_{OW} = 8,2 wyznaczono w sposób dokładny za pomocą metody powolnego mieszania (1). Jest to zatem podejście eksperymentalne odpowiednie do bezpośredniego wyznaczania P_{OW} dla silnie hydrofobowych substancji.

2. Inne metody wyznaczania współczynnika podziału 1-oktanol/woda (P_{OW}) to metoda wytrząsania w kolbie (2) oraz wyznaczanie P_{OW} za pomocą badania retencji w wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z odwróconymi fazami (3). Metoda wytrząsania w kolbie jest podatna na artefakty związane z przechodzeniem mikrokropelek oktanolu do fazy wodnej. W miarę wzrostu P_{OW} obecność tych kropelek w fazie wodnej prowadzi do coraz większego przeszacowywania stężenia substancji badanej w wodzie. Zastosowanie metody jest zatem ograniczone do substancji o log P_{OW} < 4. Druga metoda oparta jest na wiarygodnych, bezpośrednio wyznaczonych wartościach P_{OW}, które służą do kalibracji zależności pomiędzy retencją w HPLC a mierzonymi wartościami P_{OW}. Dostępny był projekt wytycznych OECD w sprawie wyznaczania współczynników podziału 1-oktanol/woda dla substancji podatnych na dysocjację (4), ale nie należy już z nich korzystać.

3. Niniejszą metodę badawczą opracowano w Niderlandach. Precyzja opisanej tutaj metody została zwalidowana i zoptymalizowana w międzylaboratoryjnym badaniu walidacyjnym, w którym brało udział 15 laboratoriów (5).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

Znaczenie i zastosowanie

4. Wykazano, że dla obojętnych substancji organicznych występuje bardzo istotna zależność pomiędzy współczynnikiem podziału 1-oktanol/woda (P_{OW}) a ich bioakumulacją w rybach. Wykazano ponadto, że P_{OW} jest skorelowany z toksycznością dla ryb, jak również z sorpcją substancji chemicznych przez ciała stałe takie jak gleby i osady. Wyczerpujący przegląd tych zależności znajduje się w pozycji literaturowej (6).

5. Określono wiele różnorodnych zależności pomiędzy współczynnikiem podziału 1-oktanol/woda a innymi właściwościami substancji mającymi znaczenie dla toksykologii i chemii środowiska. W rezultacie współczynnik podziału 1-oktanol/woda stał się kluczowym parametrem w szacowaniu ryzyka stosowania chemikaliów dla środowiska, jak również w przewidywaniu losów chemikaliów w środowisku.

Zakres

6. Doświadczenie oparte na powolnym mieszaniu w założeniach ma na celu ograniczenie tworzenia mikrokropelek 1-oktanolu w fazie wodnej. W rezultacie nie dochodzi do przeszacowania stężenia w roztworze wodnym będącego skutkiem obecności cząsteczek substancji badanej w takich kropelkach. Metoda powolnego mieszania nadaje się zatem szczególnie do wyznaczania P_{OW} dla substancji, dla których oczekiwana wartość log P_{OW} wynosi 5 i więcej i dla których metoda wytrząsania w kolbie (2) może dawać błędne wyniki.

▼M4

DEFINICJA I JEDNOSTKI

7. Współczynnik podziału substancji między wodę a rozpuszczalnik lipofilowy (1-oktanol) jest miarą podziału w stanie równowagi danej substancji między dwie fazy. Współczynnik podziału między wodę a 1-oktanol (P_{OW}) definiuje się jako stosunek stężeń w stanie równowagi substancji badanej w 1-oktanolu nasyconym wodą (C_O) i w wodzie nasyconej 1-oktanolem (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Jako stosunek stężeń jest to wielkość bezwymiarowa. Najczęściej podawana jest w formie logarytmu dziesiętnego (log P_{OW}). Współczynnik P_{OW} zależy od temperatury i podawane dane powinny obejmować temperaturę pomiaru.

ZASADA METODY

8. Aby wyznaczyć współczynnik podziału, ustala się stan równowagi dla wody, 1-oktanolu i substancji badanej zmieszanych ze sobą w stałej temperaturze. Następnie wyznacza się stężenia substancji badanej w obu fazach.

9. W proponowanym tutaj doświadczeniu metodą powolnego mieszania można ograniczyć problemy związane z tworzeniem mikrokropelek w doświadczeniu metodą wytrząsania w kolbie. W doświadczeniu metodą powolnego mieszania stan równowagi dla wody, 1-oktanolu i substancji badanej ustala się w reaktorze z termostatem, w którym zachodzi mieszanie. Przyspiesza ono wymianę pomiędzy fazami. Mieszanie wprowadza niewielkie turbulencje zwiększające stopień wymiany między 1-oktanolem a wodą bez tworzenia mikrokropelek (1).

ZAKRES ZASTOSOWANIA METODY BADANIA

10. Ponieważ na współczynnik aktywności substancji badanej może wpłynąć obecność innych substancji, należy badać substancję w formie czystej. Do wyznaczania współczynnika podziału 1-oktanol/woda należy użyć substancji o największym stopniu czystości, jaka jest dostępna w handlu.

11. Niniejsza metoda ma zastosowanie do substancji czystych, które nie ulegają dysocjacji ani asocjacji i nie wykazują znaczącej aktywności na granicy faz. Metodę można stosować do wyznaczania współczynnika podziału 1-oktanol/woda takich substancji oraz mieszanin. W przypadku stosowania tej metody do mieszanin wyznaczone współczynniki podziału 1-oktanol/woda są warunkowe i zależą od składu chemicznego badanej mieszaniny oraz od składu elektrolitowego fazy wodnej. Metodę można również zastosować, pod warunkiem podjęcia dodatkowych kroków, do związków dysocjujących lub asocjujących (pkt 12).

12. Ponieważ przy podziale substancji dysocjujących, takich jak kwasy organiczne i fenole oraz zasady organiczne i związki metaloorganiczne, w wodzie i 1-oktanolu występuje wiele stanów równowagi, współczynnik podziału 1-oktanol/woda jest w takich przypadkach stałą warunkową, której wartość jest silnie zależna od składu elektrolitowego (7) (8). Wyznaczenie współczynnika podziału 1-oktanol/woda wymaga zatem kontrolowania i podania w sprawozdaniu wartości pH oraz składu elektrolitowego podczas doświadczenia. Do oceny tych współczynników podziału wymagana jest specjalistyczna wiedza. Na podstawie stałej (stałych) dysocjacji należy wybrać odpowiednie wartości pH, takie, aby wyznaczyć współczynnik podziału dla każdego stopnia jonizacji. Przy badaniu związków metaloorganicznych wymagane jest stosowanie takich substancji buforowych, które nie tworzą kompleksów (8). Należy dobrać warunki doświadczenia, uwzględniając aktualny stan wiedzy na temat chemii roztworów wodnych (stałych trwałości kompleksów, stałych dysocjacji), w taki sposób, aby można było oszacować specjację chemiczną substancji badanej w fazie wodnej. Należy zapewnić identyczną moc jonową we wszystkich doświadczeniach poprzez zastosowanie elektrolitu podstawowego.

▼M4

13. Przy badaniu substancji o bardzo małej rozpuszczalności w wodzie lub wysokim P_{OW} mogą pojawić się problemy w związku ze stężeniami substancji w wodzie tak niskimi, że ich dokładne oznaczenie będzie trudne. Niniejsza metoda badawcza obejmuje wytyczne w zakresie rozwiązywania tego problemu.

INFORMACJE NA TEMAT SUBSTANCJI BADANEJ

14. Należy stosować odczynniki czyste do analizy lub o wyższej klasie czystości. Zaleca się stosowanie nieznakowanych substancji badanych o znanym składzie chemicznym i preferowanej czystości co najmniej 99 % lub znakowanych izotopowo substancji badanych o znanym składzie chemicznym i czystości radiochemicznej. W przypadku użycia znacznika o krótkim czasie połowicznego rozpadu należy zastosować poprawki na rozpad. W przypadku substancji badanych znakowanych izotopowo należy zastosować specyficzną chemicznie metodę analityczną w celu zagwarantowania, że mierzona promieniotwórczość jest bezpośrednio związana z substancją badaną.

15. Oszacowanie log P_{OW} można uzyskać za pomocą dostępnego w handlu oprogramowania do szacowania log P_{OW} lub też przy pomocy stosunku rozpuszczalności w obu rozpuszczalnikach.

16. Przed wyznaczeniem P_{OW} metodą powolnego mieszania powinny być znane następujące informacje na temat substancji badanej:

a) wzór strukturalny;

b) metody analityczne odpowiednie do oznaczenia stężenia danej sunstancji w wodzie i w 1-oktanolu;

c) stała (stałe) dysocjacji substancji podatnych na dysocjację (wytyczna OECD nr 112 (9));

d) rozpuszczalność w wodzie (10);

e) hydroliza abiotyczna (11);

f) szybka biodegradowalność (12);

g) prężność pary (13).

OPIS METODY

Wyposażenie i przyrząd

17. Wymagane jest standardowe wyposażenie laboratoryjne, w szczególności następujące sprzęty:

— mieszadła magnetyczne i pokryte teflonem mieszadła magnetyczne służące do mieszania fazy wodnej,

— instrumenty analityczne odpowiednie do oznaczania stężenia substancji badanej na oczekiwanych poziomach stężenia,

— naczynie do mieszania z zaworem w dolnej części. W zależności od oszacowania log P_{OW} i granicy wykrywalności (LOD) związku badanego należy rozważyć zastosowanie naczynia reakcyjnego o takiej samej geometrii i pojemności większej niż litr, tak aby można było uzyskać wystarczającą objętość wody do celów ekstrakcji i analizy chemicznej. Dzięki temu uzyskane zostanie wyższe stężenie w wyciągu wodnym i oznaczenie analityczne będzie bardziej wiarygodne. Tabela z podanymi oszacowaniami minimalnej potrzebnej objętości, LOD dla danego związku, szacowanej dla niego wartości log P_{OW} oraz rozpuszczalności w wodzie znajduje się w dodatku 1. Dane w tabeli podano na podstawie zależności pomiędzy log P_{OW} a stosunkiem rozpuszczalności w oktanolu i wodzie zgodnie z publikacją Pinsuwan *et al.* (14):

$$\log P_{OW} = 0{,}88 \log SR + 0{,}41$$

▼M4

gdzie:

$SR = S_{oct}/S_w$ (wyrażone jako stężenia molowe);

oraz podanej przez Lymana (15) zależności pozwalającej przewidywać rozpuszczalność w wodzie. Rozpuszczalność w wodzie obliczoną według równania podanego w dodatku 1 trzeba traktować jako pierwsze oszacowanie. Należy zauważyć, że użytkownik ma swobodę w szacowaniu rozpuszczalności w wodzie dowolną metodą, którą uznaje się za lepsze odzwierciedlenie zależności między hydrofobowością a rozpuszczalnością. W przypadku związków stałych zaleca się na przykład uwzględnienie temperatury topnienia w przewidywaniu rozpuszczalności. Jeżeli stosuje się równanie zmodyfikowane, należy się upewnić, czy równanie służące do obliczania rozpuszczalności w oktanolu nadal jest poprawne. Schematyczny rysunek naczynia z płaszczem szklanym do termostatowania z mieszadłem, o objętości ok. 1 litra znajduje się w dodatku 2. Proporcje naczynia przedstawionego w dodatku 2 okazały się korzystne i należy je utrzymać w przypadku używania przyrządu o innych rozmiarach,

— podczas doświadczenia wykonywanego metodą powolnego mieszania konieczny jest sprzęt do utrzymywania temperatury na stałym poziomie.

18. Naczynia powinny być wykonane z obojętnego materiału, tak aby efekt adsorpcji na powierzchni naczynia był nieznaczny.

Przygotowanie roztworów do badania

19. Wyznaczenie P_{OW} należy przeprowadzać przy użyciu 1-oktanolu o najwyższej czystości, jaka jest dostępna w handlu (co najmniej +99 %). Zaleca się oczyszczanie 1-oktanolu poprzez ekstrakcję kwasem, zasadą i wodą, a następnie osuszanie. Do oczyszczania 1-oktanolu można ponadto zastosować destylację. Oczyszczony 1-oktanol służy do przygotowania standardowych roztworów substancji badanych. Woda wykorzystywana w wyznaczeniu P_{OW} powinna być destylowana w destylatorze szklanym lub wykonanym ze szkła kwarcowego, bądź uzyskana z układu oczyszczania, można też użyć wody o czystości HPLC. W przypadku wody destylowanej wymagane jest filtrowanie przez filtr 0,22 μm, należy także przeprowadzić ślepe próby w celu sprawdzenia, czy w stężonych ekstraktach nie ma zanieczyszczeń, które mogą wpływać na substancję badaną. W przypadku gdy stosowany jest filtr z włókna szklanego, należy go oczyścić poprzez wypalanie przez co najmniej trzy godziny w temperaturze 400 °C.

20. Oba rozpuszczalniki przed wykonaniem doświadczenia powinny zostać wzajemnie nasycone w drodze ustalania stanu równowagi w wystarczająco dużym naczyniu. Stan równowagi osiąga się poprzez powolne mieszanie układu dwufazowego przez dwa dni.

21. Wybrać odpowiednie stężenie substancji badanej i rozpuścić substancję w 1-oktanolu (nasyconym wodą). Należy wyznaczyć współczynnik podziału 1-oktanol/woda w rozcieńczonych roztworach w 1-oktanolu oraz w wodzie. Stężenie substancji badanej nie powinno zatem przekraczać 70 % jej rozpuszczalności, przy stężeniu w obu fazach wynoszącym maksymalnie 0,1 M (1). Roztwory w 1-oktanolu używane w doświadczeniu muszą być wolne od zawiesiny nierozpuszczonych cząstek substancji badanej.

22. Odpowiednią ilość substancji badanej rozpuścić w 1-oktanolu (nasyconym wodą). Jeżeli szacowana wartość log P_{OW} przekracza 5, należy dopilnować, aby roztwory w 1-oktanolu używane w doświadczeniu były wolne od zawiesiny nierozpuszczonych cząstek substancji badanej. W tym celu stosuje się następującą procedurę dla chemikaliów o szacowanej wartości log $P_{OW} > 5$:

— substancję badaną rozpuścić w 1-oktanolu (nasyconym wodą),

▼M4

— pozostawić roztwór na czas wystarczający, aby zawieszone nierozpuszczone cząstki substancji opadły na dno. Podczas osiadania monitorować stężenie substancji badanej,

— po ustabilizowaniu się wartości mierzonych stężeń w roztworze 1-oktanolu rozcieńczyć roztwór podstawowy dodając odpowiednią objętość 1-oktanolu,

— wykonać pomiar stężenia roztworu podstawowego. Jeżeli zmierzone stężenie odpowiada rozcieńczeniu, można użyć rozcieńczonego roztworu w doświadczeniu metodą powolnego mieszania.

Ekstrakcja i analiza próbek

23. Do oznaczenia substancji badanej należy użyć zwalidowanej metody analitycznej. Wykonujący badanie muszą wykazać, że stężenia w 1-oktanolu nasyconym wodą oraz w fazie wodnej nasyconej 1-oktanolem podczas doświadczenia przekraczają granicę oznaczalności w stosowanych metodach analitycznych. W przypadkach, w których potrzebne są metody ekstrakcji, przed doświadczeniem trzeba ustalić odzysk analityczny substancji badanej z fazy wodnej i 1-oktanolu. Sygnały analityczne należy skorygować o ślepą próbę i dopilnować, aby nie było możliwe przeniesienie analitu z jednej próbki do innej.

24. Przed analizą może być potrzebna ekstrakcja fazy wodnej za pomocą rozpuszczalnika organicznego oraz wstępne zatężanie ekstraktu w związku z dość niskimi stężeniami hydrofobowych substancji badanych w fazie wodnej. Z tego samego powodu konieczne jest zmniejszenie stężeń dla ewentualnych ślepych prób. W tym celu trzeba stosować rozpuszczalniki o wysokiej czystości, najlepiej rozpuszczalniki do analizy pozostałości. W uniknięciu zanieczyszczeń krzyżowych może ponadto pomóc używanie starannie wyczyszczonego sprzętu szklanego (np. mytego w rozpuszczalniku lub wypalanego w podwyższonej temperaturze).

25. Oszacowanie log P_{OW} można uzyskać z programu służącego do szacowania lub na podstawie specjalistycznej wiedzy. Jeżeli oszacowana wartość przekracza 6, należy bliżej przyjrzeć się korektom o ślepą próbę oraz przenoszeniu analitu. W przypadku gdy oszacowana wartość log P_{OW} jest większa od 6, obowiązkowe jest również zastosowanie wzorca zastępczego do określenia korekty o odzysk, tak aby można było uzyskać wysoki współczynnik zatężenia wstępnego. W handlu dostępnych jest szereg programów komputerowych służących do szacowania log P_{OW} [1], np. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) czy ACD log P (19). Opis metod szacowania można znaleźć w pozycjach literaturowych (20–22).

26. Granice oznaczalności (LOQ) dla oznaczania substancji badanej w 1-oktanolu i w wodzie ustalić zatwierdzonymi metodami. Zasadniczo za granicę oznaczalności danej metody można przyjąć takie stężenie w wodzie lub 1-oktanolu, dla którego stosunek sygnału do szumu wynosi 10. Należy wybrać odpowiednią metodę ekstrakcji i zatężania wstępnego, a także określić odzysk analityczny. Aby otrzymać sygnał o odpowiedniej mocy, przy oznaczaniu analitycznym wybiera się odpowiedni współczynnik zatężania wstępnego.

[1] Informacje te podano tylko dla wygody użytkowników. Można korzystać z innych, równoważnych programów komputerowych, jeżeli da się wykazać, że wyniki obliczeń są takie same.

▼M4

27. Na podstawie parametrów metody analitycznej i oczekiwanych stężeń wyznaczyć przybliżoną wielkość próbki potrzebnej do dokładnego oznaczenia stężenia związku. Należy unikać używania próbek fazy wodnej zbyt małych, aby uzyskać wystarczający sygnał analityczny. Nie należy również stosować nadmiernie dużych próbek fazy wodnej, ponieważ mogłoby pozostać zbyt mało wody, aby przeprowadzić wymaganą minimalną liczbę analiz (n = 5). W dodatku 1 minimalna objętość próbki podana jest jako funkcja objętości naczynia, granicy wykrywalności substancji badanej i jej rozpuszczalności.

28. Ilościowego oznaczenia substancji badanych dokonuje się poprzez porównanie z krzywymi kalibracyjnymi dla odpowiedniego związku chemicznego. Wartości stężeń w analizowanych próbkach muszą mieścić się pomiędzy wartościami stężeń wzorców.

29. W przypadku substancji badanych o szacowanej wartości log P_{OW} przekraczającej 6 przed ekstrakcją należy dodać do próbki fazy wodnej wzorzec zastępczy w celu rejestracji strat zachodzących podczas ekstrakcji i wstępnego zatężania próbek fazy wodnej. Dla dokładnego obliczenia korekty o odzysk wzorce zastępcze muszą mieć właściwości bardzo zbliżone do substancji badanej lub z nią identyczne. Do tego celu najlepiej jest użyć analogów danej substancji (trwale) znakowanych izotopowo (np. deuterowanych w maksymalnym stopniu lub znakowanych ^{13}C). Jeżeli nie jest możliwe zastosowanie znakowanych izotopów trwałych, tj. ^{13}C lub ^{2}H, należy za pomocą wiarygodnych danych literaturowych wykazać, że właściwości fizykochemiczne substancji zastępczej są bardzo bliskie właściwościom substancji badanej. Przy ekstrakcji ciecz-ciecz z fazy wodnej mogą powstawać emulsje. Można to ograniczyć poprzez dodanie soli i pozostawienie emulsji na noc, aby osiadła. Metody ekstrakcji i wstępnego zatężania próbek trzeba podać w sprawozdaniu.

30. Próbki pobrane z fazy 1-oktanolu można w razie potrzeby rozcieńczyć odpowiednim rozpuszczalnikiem przed analizą. Ponadto zaleca się użycie wzorca zastępczego do obliczenia korekty o odzysk w przypadku substancji, dla których wyniki doświadczeń z odzyskiem wykazały dużą zmienność (względne odchylenie standardowe > 10 %).

31. Szczegóły metody analitycznej trzeba zamieścić w sprawozdaniu. Obejmuje to metodę ekstrakcji, współczynniki wstępnego zatężania i rozcieńczania, parametry przyrządów, procedurę kalibracji, zakres kalibracji, odzysk analityczny substancji badanej z wody, dodawanie wzorców zastępczych w celu obliczenia korekty o odzysk, wartości ślepych prób, granice wykrywalności i granice oznaczalności.

Wykonanie badania

Optymalny stosunek objętości 1-oktanol/woda

32. Przy dobieraniu odpowiednich objętości wody i 1-oktanolu należy uwzględnić LOQ w 1-oktanolu i wodzie, współczynniki zatężania wstępnego stosowane do próbek wody, objętości próbek pobranych z fazy 1-oktanolu i wody oraz oczekiwane stężenia. Dla ułatwienia doświadczenia należy wybrać taką objętość 1-oktanolu w układzie powolnego mieszania, aby warstwa 1-oktanolu miała grubość wystarczającą (> 0,5 cm) do pobierania próbek z fazy 1-oktanolu bez jej naruszania.

33. Typowe objętości faz stosowane przy oznaczaniu związków o log P_{OW} równych 4,5 i więcej to 20–50 ml 1-oktanolu i 950–980 ml wody w naczyniu jednolitrowym.

▼M4

Warunki badania

34. W trakcie badania za pomocą termostatu ustalić temperaturę w naczyniu reakcyjnym tak, aby ograniczyć wahania temperatury do wartości poniżej 1 °C. Oznaczenie należy przeprowadzić w temperaturze 25 °C.

35. Układ doświadczalny należy chronić przed światłem słonecznym poprzez przeprowadzanie doświadczenia w ciemnym pomieszczeniu albo przykrycie naczynia reakcyjnego folią aluminiową.

36. Doświadczenie należy przeprowadzać w środowisku wolnym od pyłu (w jak największym stopniu).

37. Układ 1-oktanol-woda mieszać aż do osiągnięcia stanu równowagi. W doświadczeniu pilotażowym ocenia się długość okresu ustalania stanu równowagi poprzez przeprowadzenie doświadczenia metodą powolnego mieszania i okresowe pobieranie próbek wody oraz 1-oktanolu. Próbki należy pobierać nie częściej niż co pięć godzin.

38. Każda procedura wyznaczania P_{OW} musi obejmować co najmniej trzy niezależne doświadczenia metodą powolnego mieszania.

Wyznaczanie czasu ustalania stanu równowagi

39. Przyjmuje się, że stan równowagi jest ustalony wtedy, gdy krzywa regresji stosunku stężeń w 1-oktanolu/wodzie względem czasu przez cztery punkty czasowe ma nachylenie nieróżniące się znacznie od zera przy granicznym poziomie istotności równym 0,05. Minimalny czas ustalania równowagi przed rozpoczęciem pobierania próbek to jeden dzień. Z reguły pobieranie próbek substancji o szacowanej wartości log P_{OW} mniejszej niż 5 można przeprowadzić na drugi i trzeci dzień. W przypadku związków bardziej hydrofobowych może zajść konieczność wydłużenia czasu ustalania równowagi. Dla związku o log P_{OW} = 8,23 (dekachlorobifenyl) do ustalenia stanu równowagi wystarczyły 144 godziny. Stan równowagi ocenia się poprzez powtarzanie pobierania próbek z pojedynczego naczynia.

Rozpoczynanie doświadczenia

40. Na początku doświadczenia napełnić naczynie reakcyjne wodą nasyconą 1-oktanolem. Należy pozostawić układ na czas wystarczający do osiągnięcia temperatury ustalonej za pomocą termostatu.

41. Do naczynia reakcyjnego ostrożnie dodać pożądaną ilość substancji badanej (rozpuszczoną w wymaganej ilości 1-oktanolu nasyconego wodą). Jest to kluczowy etap doświadczenia, ponieważ konieczne jest uniknięcie gwałtownego zmieszania obu faz. W tym celu fazę 1-oktanolową można powoli podawać pipetą na ściankę naczynia, blisko powierzchni wody. Roztwór spłynie wzdłuż szklanej ścianki i utworzy film na powierzchni fazy wodnej. Należy zawsze unikać wlewania 1-oktanolu bezpośrednio do naczynia – krople 1-oktanolu nie powinny wpadać bezpośrednio do wody.

42. Po rozpoczęciu mieszania jego prędkość należy powoli zwiększać. Jeżeli nie da się odpowiednio wyregulować silników mieszadła, należy rozważyć zastosowanie transformatora. Prędkość mieszania należy wyregulować tak, aby powstał wir na styku wody i 1-oktanolu, o głębokości od 0,5 do maksymalnie 2,5 cm. Prędkość mieszania należy zmniejszyć, jeśli grubość wiru przekroczy 2,5 cm; w przeciwnym razie z kropelek 1-oktanolu w fazie wodnej mogą powstać mikrokropelki, co może spowodować przeszacowanie stężenia substancji badanej w wodzie. Maksymalną prędkość mieszania powodującą powstanie 2,5 cm wiru zaleca się na podstawie wyników międzylaboratoryjnego badania walidacyjnego (5). Jest to kompromis pomiędzy szybkim ustalaniem równowagi a zapobieganiem tworzeniu mikrokropelek 1-oktanolu.

▼M4

Pobieranie i przygotowywanie próbek

43. Przed pobieraniem próbek mieszadło należy wyłączyć i pozostawić układ, aż płyny znieruchomieją. Po ukończeniu pobierania próbek uruchomić mieszadło ponownie na wolnych obrotach, jak opisano powyżej, i stopniowo zwiększa się prędkość mieszania.

44. Próbkę fazy wodnej pobiera się przez zawór znajdujący się w dolnej części naczynia reakcyjnego. Należy zawsze odrzucać objętość martwą wody znajdującą się w kranach (dla naczynia przedstawionego w dodatku 2 jest to około 5 ml). Woda w kranach nie ulega mieszaniu, a zatem nie znajduje się w równowadze z całym układem. Należy odnotować objętość próbek wody i upewnić się, że przy ustalaniu bilansu masy wzięto pod uwagę ilość substancji badanej obecnej w odrzuconej wodzie. Należy minimalizować straty związane z parowaniem poprzez umożliwienie spokojnego przepływu wody do rozdzielacza, tak aby warstwa styku wody/1-oktanolu pozostała nienaruszona.

45. Próbki fazy 1-oktanolu uzyskuje się poprzez pobranie małej podwielokrotnej części (ok. 100 μl) z warstwy 1-oktanolu za pomocą strzykawki o objętości 100 mikrolitrów wykonanej wyłącznie ze szkła i metalu. Należy uważać, aby nie naruszyć warstwy styku rozpuszczalników. Objętość pobranej cieczy jest zapisywana. Wystarczy mała podwielokrotność, ponieważ próbka fazy 1-oktanolu będzie rozcieńczana.

46. Należy unikać zbędnych etapów polegających na przenoszeniu próbki. W tym celu objętość próbki należy wyznaczyć grawimetrycznie. W przypadku próbek fazy wodnej można to uzyskać poprzez pobieranie próbki roztworu do rozdzielacza, który zawiera już potrzebną objętość rozpuszczalnika.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

47. Zgodnie z niniejszą metodą badawczą P_{OW} wyznacza się, wykonując trzy doświadczenia metodą powolnego mieszania (w trzech jednostkach doświadczalnych) dla badanego związku, w identycznych warunkach. Analiza metodą regresji zastosowana do wykazania, że osiągnięty został stan równowagi, powinna być oparta na wynikach co najmniej czterech oznaczeń C_O/C_W w następujących po sobie punktach czasowych. Umożliwia to obliczenie wariancji jako miary niepewności wartości średniej otrzymanej przez każdą jednostkę doświadczalną.

48. P_{OW} można określić przez wariancję danych otrzymanych dla każdej jednostki doświadczalnej. Informacje te wykorzystuje się do obliczenia P_{OW} jako średniej ważonej z wyników poszczególnych jednostek doświadczalnych. Wagą jest odwrotność wariancji wyników dla jednostek doświadczalnych. W efekcie dane, dla których zmienność (wyrażana jako wariancja) jest duża, a zatem mające mniejszą wiarygodność, wpływają na wynik w mniejszym stopniu niż dane, dla których wariancja jest mała.

49. Analogicznie oblicza się ważone odchylenie standardowe. Jest ono miarą powtarzalności pomiarów P_{OW}. Niska wartość ważonego odchylenia standardowego wskazuje na to, że wyznaczenie P_{OW} w ramach jednego laboratorium dawało bardzo powtarzalne wyniki. Formalne opracowanie statystyczne danych przedstawiono w skrócie poniżej.

▼M4

Opracowanie wyników

Wykazanie, że stan równowagi został osiągnięty

50. Dla każdego pobierania próbek oblicza się logarytm stosunku stężeń substancji badanej w 1-oktanolu i w wodzie (log (C_O/C_w)). Osiągnięcie równowagi chemicznej wykazuje się za pomocą wykresu tego stosunku względem czasu. Plateau pojawiające się na tym wykresie dla co najmniej czterech kolejnych punktów czasowych wskazuje na osiągnięcie równowagi oraz na rzeczywiste rozpuszczenie związku w 1-oktanolu. W razie jego braku badanie trzeba kontynuować aż do momentu, gdy nachylenie dla czterech kolejnych punktów czasowych nie będzie znacząco różne od zera przy granicznym poziomie istotności równym 0,05, co wskazuje na niezależność log C_o/C_w od czasu.

Obliczanie log P_{OW}

51. Wartość log P_{OW} dla jednostki doświadczalnej oblicza się jako średnią ważoną log C_o/C_w dla tej części krzywej log C_o/C_w względem czasu, dla której wykazano osiągnięcie stanu równowagi. Średnią ważoną oblicza się poprzez stosowanie do danych wag będących odwrotnością wariancji, tak aby wpływ na wynik końcowy był odwrotnie proporcjonalny do niepewności danych.

Wartość średnia log P_{OW}

52. Wartość średnią log P_{OW} dla różnych jednostek doświadczalnych oblicza się jako średnią wyników dla poszczególnych jednostek doświadczalnych ważoną ich odpowiednimi wariancjami.

Obliczenie wykonuje się w następujący sposób:

$$\log P_{OW,Av} = (Sw_i \times \log P_{OW,i}) \times (Sw_i)^{-1}$$

gdzie:

$\log P_{OW,i}$ = wartość log P_{OW} dla jednostki doświadczalnej,

$\log P_{OW,Av}$ = średnia ważona wartości dla poszczególnych oznaczeń log P_{OW},

w_i = waga statystyczna przypisana wartości log P_{OW} dla jednostki doświadczalnej i.

Odwrotność wariancji log $P_{OW,i}$ występuje jako $w_i (w_i = var(\log P_{OW,i})^{-1})$.

53. Błąd średniej log P_{OW} szacowany jest jako powtarzalność log C_o/C_w wyznaczanych w fazie równowagi w poszczególnych jednostkach doświadczalnych. Wyrażany jest jako ważone odchylenie standardowe log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log\ Pow,Av}$), które z kolei jest miarą błędu związanego z log $P_{OW,Av}$. Ważone odchylenie standardowe można obliczyć z wariancji ważonej ($var_{\log\ Pow,Av}$) w następujący sposób:

$$var_{\log Pow,Av} = (Sw_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (Sw_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Symbol n oznacza liczbę jednostek doświadczalnych.

▼M4

Sprawozdanie z badania

54. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Substancja badana

— nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna, numer CAS, wzór strukturalny (z zaznaczeniem miejsca znakowania, jeżeli używa się substancji znakowanej izotopowo) oraz istotne właściwości fizykochemiczne (zob. pkt 17),

— stopień czystości substancji badanej (zanieczyszczenia),

— czystość radiochemiczna dla znakowanych substancji chemicznych i aktywność molowa (w stosownych przypadkach),

— wstępne oszacowanie log P_{ow} oraz metoda zastosowana do wyprowadzenia tej wartości.

Warunki badania

— daty wykonywania badań,

— temperatura podczas doświadczenia,

— objętości 1-oktanolu i wody na początku badania,

— objętości pobranych próbek 1-oktanolu i wody,

— objętości 1-oktanolu i wody pozostałe w naczyniach używanych do badania,

— opis naczyń używanych do badania i zastosowanych warunków mieszania (geometria mieszadła i naczynia używanego do badania, wysokość wiru w mm oraz, jeżeli jest znana, prędkość mieszania),

— metody analityczne wykorzystane do oznaczenia substancji badanej oraz granice oznaczalności danych metod,

— czasy pobierania próbek,

— pH fazy wodnej i zastosowane substancje buforowe w przypadku regulowania pH w celu badania cząsteczek podatnych na dysocjację,

— liczba powtórzeń.

Wyniki

— powtarzalność i czułość zastosowanych metod analitycznych,

— oznaczone stężenia substancji badanej w 1-oktanolu i w wodzie w funkcji czasu,

— wykazanie bilansu masy,

— temperatura oraz odchylenie standardowe zakresu temperatur podczas doświadczenia,

— regresja stosunku stężeń względem czasu,

— średnia wartość log $P_{ow,Av}$ i jej błąd standardowy,

— omówienie i interpretacja wyników,

▼M4

— przykłady surowych danych liczbowych z reprezentatywnej analizy (wszystkie surowe dane muszą być przechowywane zgodnie ze standardami DPL), w tym odzysk substancji zastępczych oraz liczba poziomów zastosowanych w kalibracji (wraz z kryteriami dla współczynnika korelacji krzywej kalibracyjnej) oraz wyniki zapewniania jakości/kontroli jakości (QA/QC),

— jeśli jest dostępne: sprawozdanie z walidacji procedury oznaczania (wskazane wśród odnośników literaturowych).

BIBLIOGRAFIA:

(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) Rozdział A.8 niniejszego załącznika. Współczynnik podziału.

(3) Rozdział A.8 niniejszego załącznika. Współczynnik podziału.

(4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paryż.

(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, Nowy Jork, 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. Paris.

(10) Rozdział A.6 niniejszego załącznika. Rozpuszczalność w wodzie.

(11) Rozdział C.7 niniejszego załącznika. Rozpad – rozpad abiotyczny: hydroliza jako funkcja pH

(12) Rozdział C.4 – część II–VII (metody A–F) niniejszego załącznika. Oznaczenie szybkiej biodegradowalności.

(13) Rozdział A.4 niniejszego załącznika. Prężność pary.

(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. W: 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 do 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, Budapeszt.

(19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Kanada 2001.

▼**M4**

(20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. W: 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 (red.), *Methoden der Organischen Chemie*: 386–390.

▼M4

Dodatek 1

Arkusz kalkulacyjny do obliczania minimalnych objętości wody wymaganych dla wykrywania substancji badanych o różnych wartościach LOG P_{OW} w fazie wodnej

Założenia:

— Maksymalna objętość poszczególnych podwielokrotnych części = 10 % objętości całkowitej; 5 podwielokrotnych części = 50 % objętości całkowitej.

— Stężenie substancji badanych = 0,7 × rozpuszczalność w obu fazach. W przypadku niższych stężeń wymagane są większe objętości.

— Objętość do wyznaczania LOD = 100 ml.

— Relacje log P_{ow} vs. log S_w oraz log P_{ow} vs. SR (S_{oct}/S_w) w uzasadnionym zakresie odzwierciedlają związki dla substancji badanych.

Oszacowanie S_w

log P_{ow}	Równanie	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

Oszacowanie S_{oct}

log P_{ow}	Równanie	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**

Masa całkowita substancji badanej (mg)	$Masa_{oktanolu}$/ $Masa_{wody}$	$Masa_{H2O}$ (mg)	$Stęż_{H2O}$ (mg/l)	$Masa_{oktanolu}$ (mg)	$Stęż_{oktanolu}$ (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

Obliczanie objętości

Minimalna objętość wymagana dla fazy H_2O przy każdym stężeniu 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
Objętość zastosowana dla LOD (I)	0,1					

Legenda do obliczeń

Stanowi < 10 % całkowitej objętości fazy wodnej, naczynie do ustalania równowagi o objętości 1 litra.

Stanowi < 10 % całkowitej objętości fazy wodnej, naczynie do ustalania równowagi o objętości 2 litrów.

Stanowi < 10 % całkowitej objętości fazy wodnej, naczynie do ustalania równowagi o objętości 5 litrów.

Stanowi < 10 % całkowitej objętości fazy wodnej, naczynie do ustalania równowagi o objętości 10 litrów.

Przekracza 10 % nawet dla 10-litrowego naczynia do ustalania równowagi.

▼M4

Przegląd wymaganych objętości jako funkcji rozpuszczalności w wodzie i log P_{OW}

Minimalna objętość wymagana dla fazy H_2O przy każdym stężeniu 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

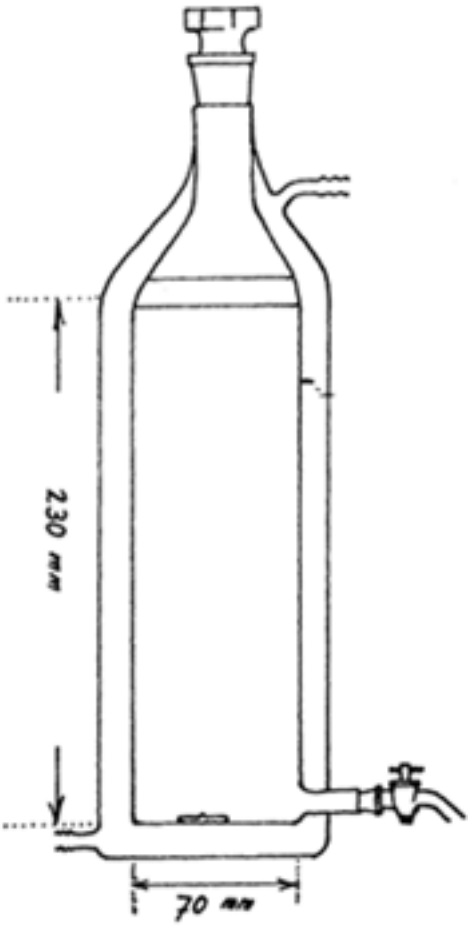
▼**M4**

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
Objętość zastosowana dla LOD (I)		0,1					

▼M4

Dodatek 2

Przykład naczynia z płaszczem szklanym do wyznaczania P_{OW} metodą powolnego mieszania



▼M6

A.24. WSPÓŁCZYNNIK PODZIAŁU (N-OKTANOL/WODA), METODA WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC)

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 117 (2004).

1. Współczynnik podziału (P) definiuje się jako stosunek stężeń (C) w stanie równowagi substancji rozpuszczonej w układzie dwufazowym, składającym się z dwóch zasadniczo niemieszających się ze sobą rozpuszczalników. W przypadku n-oktanolu i wody:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{oktanol}}{C_{\text{woda}}}$$

Współczynnik podziału będący ilorazem dwóch stężeń jest bezwymiarowy i na ogół podaje się go w postaci jego logarytmu o podstawie 10.

2. P_{ow} jest kluczowym parametrem w badaniach wpływu substancji chemicznych na środowisko. Wykazano, że istnieje bardzo istotna zależność między P_{ow} niezjonizowanej postaci substancji a bioakumulacją tych substancji w rybach. Wykazano również, że P_{ow} jest przydatnym parametrem do celów przewidywania adsorpcji na glebie i osadach oraz ustalania ilościowych zależności struktura-aktywność dla szerokiego zakresu skutków biologicznych.

3. Pierwotna propozycja dotycząca tej metody badawczej opierała się na artykule autorstwa C.V. Eadsforth i P. Moser (1). Agencja Umweltbundesamt Republiki Federalnej Niemiec koordynowała w 1986 r. opracowywanie metody badawczej oraz międzylaboratoryjne badanie porównawcze (2).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

4. Wartości logarytmu P_{ow}w przedziale – 2–4 (niekiedy do 5 i więcej) ([1]) można określić doświadczalnie za pomocą metody wstrząsania kolby (rozdział A.8 niniejszego załącznika, dotycząca badań wytyczna OECD nr 107). Metoda HPLC obejmuje logarytm P_{ow} w przedziale od 0 do 6 (1)(2)(3)(4)(5). Metoda ta może wymagać oszacowania P_{ow}, w celu przypisania odpowiednich substancji odniesienia i poparcia wszelkich wniosków wyciągniętych na podstawie danych wygenerowanych w ramach badania. Metody obliczania omówiono krótko w dodatku do niniejszej metody badawczej. Tryb działania HPLC ma charakter izokratyczny.

5. Wartości P_{ow} zależą od warunków otoczenia, takich jak temperatura, pH, moc jonowa itp., i należy je zdefiniować w eksperymencie, aby umożliwić poprawną interpretację danych P_{ow}. W przypadku substancji podatnych na dysocjację dostępna może stać się inna metoda (np. projekt wytycznej OECD dotyczącej metody pH-metrycznej dla substancji jonowych (6)) i można ją będzie zastosować jako metodę alternatywną. Mimo że wspomniany projekt wytycznej OECD może być właściwy do ustalenia P_{ow} odniesieniu do tych substancji podatnych na dysocjację, w niektórych przypadkach bardziej odpowiednie jest zastosowanie metody HPLC przy pH występującym w środowisku naturalnym (zob. pkt 9).

([1]) Górną granicę stosuje się z uwagi na konieczność uzyskania fazy kompletnego rozdzielenia po dostosowaniu równowagi podziału i przed pobraniem próbek do oznaczeń analitycznych. Przy zachowaniu należytej dbałości górną granicę można podnieść do wyższych wartości P_{ow}.

▼**M6**

ZASADA METODY

6. Metoda HPLC w układzie faz odwróconych jest wykonywana na kolumnach analitycznych wypełnionych dostępną na rynku fazą stałą zawierającą długołańcuchowe węglowodory (np. C8, C18) chemicznie związane na krzemionce.

7. Substancja chemiczna wstrzyknięta do takiej kolumny rozdziela się na rozpuszczalnikową fazę ruchomą i węglowodorową fazę stacjonarną, w miarę jak jest transportowana w kolumnie przez fazę ruchomą. Substancje są zatrzymywane proporcjonalnie do ich współczynnika podziału węglowodór-woda, przy czym pierwsze są wymywane substancje hydrofilowe, a ostatnie – substancje lipofilowe. Czas retencji opisuje się jako współczynnik retencji k podany za pomocą wyrażenia:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

gdzie t_R oznacza czas retencji substancji badanej, a t_0 oznacza czas martwy, tj. średni czas przejścia cząsteczki rozpuszczalnika przez kolumnę. Nie są wymagane analizy ilościowe, konieczne jest tylko oznaczenie czasu retencji.

8. Współczynnik podziału oktanol/woda substancji badanej można obliczyć poprzez doświadczalne określenie jego współczynnika retencji k, a następnie wprowadzenie k do następującego równania:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

gdzie

a, b = współczynniki regresji liniowej.

Powyższe równanie można również uzyskać, przeprowadzając regresję liniową logarytmu współczynników podziału oktanol/woda substancji odniesienia w odniesieniu do logarytmu współczynników retencji substancji odniesienia.

9. Metoda HPLC w układzie faz odwróconych fazami umożliwia oszacowanie współczynników podziału w logarytmie P_{ow} w przedziale od 0 do 6, ale w wyjątkowych przypadkach można ją rozszerzyć tak, aby objęła logarytm P_{ow}w przedziale od 6 do 10. Może to wymagać modyfikacji fazy ruchomej (3). Metoda ta nie ma zastosowania do mocnych kwasów i zasad, związków kompleksowych metali, substancji, które reagują z eluentem ani do środków powierzchniowo czynnych. Pomiary można wykonywać na substancjach podatnych na dysocjację w ich niezjonizowanej postaci (wolny kwas lub wolna zasada) jedynie poprzez zastosowanie odpowiedniego roztworu buforowego o pH poniżej pK_a dla wolnego kwasu lub powyżej pK_a dla wolnej zasady. Alternatywnie, do badania substancji podatnych na dysocjację dostępna może być metoda pH-metryczna (6) i można ją zastosować jako metodę alternatywną (6). Jeżeli wartość logarytmu P_{ow} określa się w celu zastosowania w klasyfikacji zagrożeń dla środowiska lub w ocenie ryzyka środowiskowego, badanie należy przeprowadzić w przedziale pH odpowiednim dla środowiska naturalnego, tj. w przedziale pH 5,0–9.

10. W niektórych przypadkach zanieczyszczenia mogą utrudnić interpretację wyników z uwagi na niepewność pomiaru przy wyznaczaniu piku. Dla mieszanin dających nierozdzielone pasmo należy podać górną i dolną granicę logarytmu P_{ow} oraz powierzchnię procentową każdego piku logarytmu P_{ow}. Dla mieszanin będących grupami homologów należy również podać średnią ważoną logarytmu P_{ow} (7), obliczoną w oparciu o pojedyncze wartości P_{ow} i odpowiadające im wartości powierzchni procentowej (8). W obliczeniach należy uwzględnić wszystkie piki mające powierzchnię 5 % lub większą w ramach całkowitej powierzchni piku (9):

▼**M6**

$$\textit{średnia ważona } \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\textit{powierzchnia \%})}{\textit{całkowita powierzchnia pików \%}} = \frac{\sum (\log P_{owi})(\textit{powierzchnia \%}_i)}{\sum_i \textit{powierzchnia \%}}$$

Logarytm P_{ow} średniej ważonej jest ważny jedynie dla substancji lub mieszanin (np. olej talowy) składających się z homologów (np. serii alkanów). Można wykonać pomiary mieszanin dające konkretne wyniki, pod warunkiem że czułość zastosowanego detektora analitycznego jest taka sama w odniesieniu do wszystkich substancji w mieszaninie i że mogą one zostać odpowiednio rozdzielone.

INFORMACJE NA TEMAT SUBSTANCJI BADANEJ

11. Przed zastosowaniem metody powinny być znane stała dysocjacji, wzór strukturalny oraz rozpuszczalność w fazie ruchomej. Dodatkowo przydatne byłyby informacje na temat hydrolizy.

KRYTERIA JAKOŚCI

12. W celu zwiększenia zaufania do pomiarów trzeba wykonywać po dwa oznaczenia.

— Powtarzalność: wartość logarytmu P_{ow} uzyskana z wielokrotnych pomiarów wykonanych w identycznych warunkach i z zastosowaniem tego samego zestawu substancji odniesienia powinna mieścić się w zakresie ± 0,1 jednostki logarytmicznej.

— Odtwarzalność: jeżeli pomiary powtarza się z zastosowaniem innego zestawu substancji odniesienia, wyniki mogą się różnić. Zwykle współczynnik korelacji R dla zależności między logarytmem k a logarytmem P_{ow} dla zestawu substancji badanych wynosi około 0,9, co odpowiada współczynnikowi podziału oktanol/woda logarytmu P_{ow} wynoszącemu + 0,5 jednostki logarytmicznej.

13. Z międzylaboratoryjnego badania porównawczego wynika, że można uzyskać wartości logarytmu P_{ow} metodą HPLC w zakresie + 0,5 jednostki wartości w ramach metody wstrząsania kolby (2). Inne porównania można znaleźć w literaturze przedmiotu (4)(5)(10)(11)(12). Wykres korelacji oparty na strukturalnie powiązanych substancjach odniesienia daje najdokładniejsze wyniki (13).

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

14. W celu skorelowania zmierzonego współczynnika retencji k danej substancji z jego P_{ow} trzeba ustalić wykres kalibracyjny z zastosowaniem co najmniej sześciu punktów (zob. pkt 24). Użytkownik może wybrać odpowiednie substancje odniesienia. Wartości logarytmu P_{ow} substancji odniesienia zwykle powinny obejmować logarytm P_{ow} substancji badanej, tj. P_{ow} co najmniej jednej substancji odniesienia powinien być wyższy niż substancji badanej, a P_{ow} innej substancji powinien być niższy niż substancji badanej. Ekstrapolację należy stosować wyłącznie w wyjątkowych przypadkach. Pożądane jest, aby przedmiotowe substancje odniesienia były strukturalnie powiązane z substancją badaną. Wartości logarytmu P_{ow} substancji odniesienia zastosowanych do kalibracji powinny opierać się na wiarygodnych danych doświadczalnych. Dla substancji o wysokim logarytmie P_{ow} (zwykle powyżej 4) można wykorzystać obliczone wartości, chyba że dostępne są wiarygodne dane doświadczalne. Jeżeli korzysta się z wartości ekstrapolowanych, należy podać wartość graniczną.

15. Rozszerzone wykazy wartości logarytmu P_{ow} dla wielu grup substancji chemicznych są dostępne w pozycjach bibliograficznych (14) i (15). Jeżeli dane współczynników podziału strukturalnie powiązanych substancji nie są dostępne, można zastosować bardziej ogólną kalibrację ustaloną w oparciu o inne substancje odniesienia. Zalecane substancje odniesienia oraz ich wartości P_{ow} wymieniono w tabeli 1. Dla substancji podatnych na dysocjację podane wartości mają zastosowanie do niezjonizowanej postaci. Wartości skontrolowano pod kątem wiarygodności i jakości podczas międzylaboratoryjnego badania porównawczego.

▼**M6**

Tabela 1

Zalecane substancje odniesienia

	Numer CAS	Substancja odniesienia	logarytm P_{ow}	stała dysocjacji (pKa)
1	78-93-3	2-butanon Keton metylowo-etylowy	0,3	
2	1122-54-9	4-acetylopirydyna	0,5	
3	62-53-3	Anilina	0,9	
4	103-84-4	Acetanilid	1,0	
5	100-51-6	Alkohol benzylowy	1,1	
6	150-76-5	4-metoksyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Kwas fenoksyoctowy	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	Benzonitryl	1,6	
11	140-29-4	Fenyloacetonitryl	1,6	
12	589-18-4	Alkohol 4-metylobenzylowy	1,6	
13	98-86-2	Acetofenon	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	Kwas 3-nitrobenzoesowy	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-chloroanilina	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzen	1,9	
18	104-54-1	Alkohol cynamylowy (Alkohol cynamonowy)	1,9	
19	65-85-0	Kwas benzoesowy	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	P-krezol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Kwas cynamonowy	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anizol	2,1	
23	93-58-3	Benzoesan metylu	2,1	
24	71-43-2	Benzen	2,1	
25	99-04-7	Kwas 3-metylobenzoesowy	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-chlorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trójchloroetylen	2,4	
28	1912-24-9	Atrazyna	2,6	
29	93-89-0	Benzoesan etylu	2,6	

▼**M6**

	Numer CAS	Substancja odniesienia	logarytm P_{ow}	stała dysocjacji (pKa)
30	1194-65-6	2,6-dichlorobenzonitryl	2,6	
31	535-80-8	Kwas 3-chlorobenzoesowy	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-dichloroanilina	2,8	
35	108-90-7	Chlorobenzen	2,8	
36	1746-13-0	Eter allilowo-fenylowy	2,9	
37	108-86-1	Bromobenzen	3,0	
38	100-41-4	Etylobenzen	3,2	
39	119-61-9	Benzofenon	3,2	
40	92-69-3	4-fenylofenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Tymol	3,3	
42	106-46-7	1,4-dichlorobenzen	3,4	
43	122-39-4	Difenyloamina	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalen	3,6	
45	93-99-2	Benzoesan fenylu	3,6	
46	98-82-8	Izopropylobenzen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-trichlorofenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenyl	4,0	
49	120-51-4	Benzoesan benzylu	4,0	
50	88-85-7	2,4-Dinitro-6-sec-butylofenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-trichlorobenzen	4,2	
52	143-07-7	Kwas dodekanowy	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Eter difenylowy	4,2	
54	85-01-8	Fenantren	4,5	
55	104-51-8	n-butylobenzen	4,6	
56	103-29-7	Dibenzyl	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenylopirydyna	4,9	
58	206-44-0	Fluoranten	5,1	
59	603-34-9	Trifenyloamina	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

OPIS METODY

Wstępne oszacowanie współczynnika podziału

16. W razie konieczności współczynnik podziału substancji badanej można oszacować, najlepiej stosując metodę obliczania (zob. dodatek) lub, w stosownych przypadkach, wykorzystując stosunek rozpuszczalności substancji badanej w czystych rozpuszczalnikach.

Aparatura

17. Wymagany jest chromatograf cieczowy wyposażony w niskociśnieniową pompę i odpowiedni system detekcji. Do wielu różnorodnych grup substancji chemicznych ma zastosowanie detektor UV wykorzystujący długość fali wynoszącą 210 nm lub detektor współczynnika załamania światła. Obecność grup polarnych w fazie stacjonarnej może poważnie zakłócić działanie kolumny HPLC. W związku z tym fazy stacjonarne powinny posiadać minimalną zawartość grup polarnych (16). Można stosować dostępne na rynku mikrocząsteczkowe wypełnienie dla fazy odwróconej lub gotowe wypełnione kolumny. Kolumna osłonowa może być umieszczona między systemem dozowania a kolumną analityczną.

Faza ruchoma

18. Do przygotowania eluentu, który zostaje odgazowany przed użyciem, stosuje się metanol do HPLC oraz wodę destylowaną lub dejonizowaną. Wykorzystuje się elucję izokratyczną. Należy stosować stosunki metanol/woda o minimalnej zawartości wody 25 %. Mieszanina metanol-woda o typowym stosunku 3:1 (obj.) jest zadowalająca do wymywania związków o logarytmie P 6 w ciągu jednej godziny, przy szybkości przepływu 1 ml/min. Dla substancji o logarytmie P powyżej 6 może być konieczne skrócenie czasu elucji (oraz czasów elucji substancji odniesienia) poprzez zmniejszenie polarności fazy ruchomej lub długości kolumny.

19. Substancja badana i substancje odniesienia muszą być rozpuszczalne w fazie ruchomej w stężeniu umożliwiającym ich wykrycie. Tylko w wyjątkowych przypadkach można zastosować dodatki do mieszaniny metanol-woda, ponieważ dodatki zmieniają właściwości kolumny. W takich przypadkach trzeba potwierdzić, że nie ma to wpływu na czas retencji substancji badanych ani substancji odniesienia. Jeżeli układ metanol-woda nie jest odpowiedni, można użyć innych mieszanin rozpuszczalników organicznych z wodą, na przykład etanol-woda, acetonitryl-woda lub alkohol izopropylowy (propan-2-ol)-woda.

20. Wartość pH eluentu ma znaczenie krytyczne dla substancji podatnych na dysocjację. Powinna ona znajdować się w zakresie roboczym pH kolumny, który zwykle wynosi 2–8. Zalecane jest buforowanie. Należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do strącania się soli i zniszczenia kolumny, co zachodzi w przypadku niektórych mieszanin fazy organicznej i roztworu buforowego. Pomiary HPLC w przypadku faz stacjonarnych opartych na krzemionce powyżej pH 8 nie są zwykle zalecane, gdyż użycie zasadowej fazy ruchomej może powodować gwałtowne pogorszenie się wydajności kolumny.

Substancje rozpuszczone

21. Substancje badane i substancje odniesienia muszą być wystarczająco czyste, aby można było przypisać piki w chromatogramach do odpowiednich substancji. Substancje używane do celów badania lub kalibracji są rozpuszczone, o ile to możliwe, w fazie ruchomej. Jeżeli do rozpuszczania substancji badanej i substancji odniesienia stosuje się rozpuszczalnik inny niż faza ruchoma, fazę ruchomą należy zastosować do ostatecznego rozpuszczenia przed wstrzyknięciem.

Warunki badania

22. Temperatura w trakcie wykonywania pomiarów nie może zmieniać się o więcej niż ± 1 °C.

▼M6

Oznaczenie czasu martwego t_0

23. Czas martwy t_0 można obliczyć, wykorzystując niezwiązane substancje organiczne (np. tiomocznik lub formamid). Bardziej precyzyjny czas martwy można uzyskać na podstawie zmierzonych czasów retencji lub zestawu około siedmiu członów szeregu homologicznego (np. n-alkilometyloketonów) (17). Czasy retencji t_R (n_C + 1) są wykreślane w funkcji t_R (n_C), gdzie n_C oznacza liczbę atomów węgla. Uzyskuje się linię prostą, t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0, gdzie A odpowiadające $k(n_C + 1)/k(n_C)$ jest stałe. Czas martwy t_0 uzyskuje się na podstawie punktu przecięcia (1 – A)t_0 oraz nachylenia A.

Równanie regresji

24. Następnym krokiem jest wykreślenie korelacji logarytmu k w odniesieniu do logarytmu P dla właściwych substancji odniesienia o wartościach logarytmu P zbliżonych do wartości spodziewanych dla substancji badanej. W praktyce wstrzykuje się jednocześnie 6–10 substancji odniesienia. Oznacza się czasy retencji, najlepiej przez integrator rejestrujący podłączony do systemu detekcji. Odpowiadające logarytmy współczynników retencji, logarytm k, są wykreślane w funkcji logarytmu P. Równanie regresji jest wykonywane w regularnych odstępach czasu, co najmniej raz dziennie, tak aby możliwe zmiany wydajności kolumny mogły być uwzględniane.

OZNACZANIE P_{OW} SUBSTANCJI BADANEJ

25. Substancja badana jest wstrzykiwana w najmniejszych wykrywalnych ilościach. Czas retencji oznacza się podwójnie. Współczynnik podziału substancji badanej uzyskuje się poprzez interpolację obliczonego współczynnika retencji na wykresie kalibracyjnym. Dla bardzo niskich oraz dla bardzo wysokich współczynników podziału konieczna jest ekstrapolacja. Szczególnie w tych przypadkach trzeba zwrócić uwagę na granice ufności linii regresji. Jeżeli czas retencji próby wykracza poza zakres czasów retencji uzyskanych z norm, należy podać wartość graniczną.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Sprawozdanie z badania

26. Sprawozdanie musi zawierać następujące dane:

— wstępne oszacowanie współczynnika podziału, jeżeli jest oznaczony, szacowane wartości i zastosowaną metodę; a jeżeli zastosowano metodę obliczania – jej pełny opis, w tym określenie bazy danych i szczegółowe informacje na temat wyboru fragmentów;

— substancje badane i substancje odniesienia: czystość, wzór strukturalny i numer CAS;

— opis wyposażenia i warunki pracy: kolumna analityczna, kolumna osłonowa;

— fazę ruchomą, sposoby wykrywania, zakres temperatur, pH;

— profile elucji (chromatogramy);

— czas martwy i sposób jego pomiaru;

— dane retencji oraz literaturowe wartości logarytmu P_{ow} dla substancji odniesienia użytych w kalibracji;

— szczegółowe informacje na temat dopasowania linii regresji (logarytm k w odniesieniu do logarytmu P_{ow}) oraz współczynnik korelacji linii, w tym przedziały ufności;

▼**M6**

— dane średniej retencji i interpolowaną wartość logarytmu P_{ow} substancji badanej;

— w przypadku mieszanin: chromatogram profilu elucji z zaznaczonymi wartościami granicznymi;

— wartości logarytmu P_{ow} dotyczące zakresu procentowego piku logarytmu P_{ow};

— obliczenie z zastosowaniem linii regresji;

— w stosownych przypadkach obliczoną średnią ważoną wartości logarytmu P_{ow}.

BIBLIOGRAFIA

(1) C.V. Eadsforth i P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) W. Klein, 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. Projekt wytycznej, listopad 2000 r.

(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), załącznik 10, Oviedo, 20–24 lutego 1995 r.

(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. Wersja 1.0, 3. Sierpień.

(9) E. A. Vik, S. Bakke i K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software, tom 13, s. 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. 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, Nowy Jork.

(15) C. Hansch, przewodniczący; A.J. Leo, dyr. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity – udostępnione w ramach Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, Kalifornia 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

Dodatek

Metody obliczania P_{OW}

WPROWADZENIE

1. W niniejszym dodatku przedstawiono krótkie wprowadzenie do obliczania P_{ow}. Dalsze informacje czytelnik może znaleźć w podręcznikach (1)(2).

2. Obliczone wartości P_{ow} wykorzystuje się do:

   — określania, którą metodę eksperymentalną należy zastosować: metodę wstrząsania kolby dla logarytmu P_{ow} wynoszącego – 2–4 oraz metodę HPLC dla logarytmu P_{ow} wynoszącego 0–6;

   — wybierania warunków, które mają być zastosowane w HPLC (substancje odniesienia, stosunek metanol/woda);

   — sprawdzania wiarygodności wartości uzyskanych dzięki metodom eksperymentalnym;

   — przedstawiania szacunków, w przypadku gdy nie można zastosować metod eksperymentalnych.

Zasada metod obliczania

3. Proponowane tutaj metody obliczania są oparte na teoretycznej fragmentacji cząsteczki na odpowiednie podstruktury, dla których znane są wiarygodne przyrosty logarytmu P_{ow}. Logarytm P_{ow} uzyskuje się poprzez zsumowanie wartości fragmentów i współczynników korygujących dla oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych. Dostępne są wykazy stałych fragmentu cząsteczki i współczynników korygujących (1)(2)(3)(4)(5)(6). Niektóre są regularnie aktualizowane (3).

Wiarygodność obliczonych wartości

4. Zasadniczo wiarygodność metod obliczania obniża się wraz ze wzrostem złożoności badanej substancji. W przypadku prostych cząsteczek o niskiej masie cząsteczkowej i jednej lub dwóch grupach funkcyjnych można oczekiwać odchylenia 0,1–0,3 jednostek logarytmu P_{ow} między wynikami różnych metod fragmentacji a wartościami pomiarowymi. Margines błędu będzie zależał od wiarygodności zastosowanych stałych fragmentu cząsteczki, zdolności rozpoznania oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych (np. wiązań wodorowych) oraz poprawnego zastosowania współczynników korygujących. W przypadku substancji jonizujących należy uwzględnić ładunek i stopień jonizacji (10).

π-metoda Fujity-Hanscha

5. Stała podstawienia hydrofobowego, π, pierwotnie wprowadzona przez Fujitę i in. (7), jest zdefiniowana jako:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\,(PhX) - \log P_{ow}\,(PhH)$$

gdzie PhX oznacza pochodną aromatyczną, a PhH substancję macierzystą.

$$\text{np. } ^{\pi}Cl = \log Pow\,(C6H5Cl) - \log P_{ow}\,(C6H6)$$
$$= 2{,}84 - 2{,}13$$
$$= 0{,}71$$

π-metoda jest przedmiotem szczególnego zainteresowania w przypadku substancji aromatycznych. Dostępne są π-wartości dla dużej liczby podstawników (4)(5).

Metoda Rekkera

6. Stosując metodę Rekkera (8), wartość logarytmu P_{ow} oblicza się jako:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{składniki oddziaływań})$$

▼M6

gdzie a_i oznacza liczbę przypadków, gdy dany fragment występuje w cząsteczce, a f_i oznacza przyrost logarytmu P_{ow} fragmentu. Składniki oddziaływań można wyrazić jako całkowitą wielokrotność pojedynczej stałej C_m (tak zwaną „stałą magiczną"). Stałe fragmentu cząsteczki f_i oraz C_m zostały ustalone na podstawie wykazu 1 054 doświadczalnych wartości P_{ow} dla 825 substancji poprzez zastosowanie wielokrotnej analizy regresji (6)(8). Oznaczenie składników oddziaływań przeprowadza się zgodnie z wyznaczonymi zasadami (6)(8)(9).

Metoda Hansch-Leo

7. Stosując metodę Hanscha i Leo (4), wartość logarytmu P_{ow} oblicza się jako:

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

gdzie f_i oznacza stałą fragmentu cząsteczki, F_j oznacza współczynnik korygujący, a_i i b_j oznaczają odpowiadającą częstotliwość występowania. Wykazy atomowych i grupowych wartości fragmentów oraz współczynniki korygujące F_j uzyskano metodą prób i błędów z doświadczalnych wartości $P_{ow.}$ Współczynniki korygujące podzielono na kilka różnych klas (1)(4). Opracowano pakiety oprogramowania, aby uwzględnić wszystkie zasady i współczynniki korygujące (3).

METODA POŁĄCZONA

8. Obliczanie logarytmu P_{ow} złożonych cząsteczek można znacząco poprawić, jeżeli cząsteczkę dzieli się na większe podstruktury, dla których dostępne są wiarygodne wartości logarytmu P_{ow} na podstawie tabeli (3)(4) albo na podstawie istniejących pomiarów. Takie fragmenty (np. heterocykle, antrachinon, azobenzen) mogą być potem połączone z wartościami π-Hanscha lub ze stałymi fragmentu cząsteczki Rekkera lub Leo.

Uwagi

(i) Metody obliczania mają zastosowanie tylko do substancji zjonizowanych częściowo lub w całości, w przypadku gdy uwzględniono niezbędne współczynniki korygujące.

(ii) Jeżeli można założyć, że istnieją wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, trzeba dodać odpowiadające współczynniki korygujące (od około + 0,6 do + 1,0 jednostki logarytmu P_{ow}) (1). Wskazania dotyczące występowania takich wiązań można uzyskać z modeli przestrzennych lub danych spektroskopowych.

(iii) Jeżeli możliwe jest występowanie kilku postaci tautomerycznych, podstawą do obliczeń powinna być najbardziej prawdopodobna postać.

(iv) Należy starannie prowadzić weryfikacje wykazów stałych fragmentu cząsteczki.

BIBLIOGRAFIA Z ZAKRESU METOD OBLICZANIA

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl i D. H. Rosenblatt (red.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, Nowy Jork (1982).

(2) W.J. Dunn, J.H. Block i R. S. Pearlman (red.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (Nowy Jork) i Oxford (1986).

(3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, Kalifornia 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, Nowy Jork (1979).

▼**M6**

(5) 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, tom 1, Elsevier, Nowy Jork (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, s. 225, Amerykańskie Towarzystwo Chemiczne, Waszyngton, D.C. (1984).

▼M7

A.25. **STAŁE DYSOCJACJI W WODZIE (METODA MIARECZKOWA – METODA SPEKTROFOTOMETRYCZNA – METODA KONDUKTOMETRYCZNA)**

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 112 (1981).

Warunki wstępne

— odpowiednia metoda analityczna;

— rozpuszczalność w wodzie.

Wytyczne

— wzór strukturalny;

— przewodność elektryczna dla metody konduktometrycznej.

Oświadczenia kwalifikujące

— wszystkie metody badawcze można przeprowadzić na substancjach czystych lub substancjach o jakości handlowej. Należy rozważyć ewentualny wpływ zanieczyszczeń na wyniki;

— metoda miareczkowa nie jest odpowiednia w przypadku substancji o niskiej rozpuszczalności (zob. poniższa sekcja poświęcona roztworom do badań);

— metodę spektrofotometryczną stosuje się wyłącznie w odniesieniu do substancji o znacząco różniących się widmach absorpcyjnych UV/VIS dla form zdysocjowanych i niezdysocjowanych. Metoda ta jest również odpowiednia w przypadku substancji o niskiej rozpuszczalności i w przypadku dysocjacji bez użycia kwasów / z użyciem zasad, np. tworzenia kompleksów;

— w sytuacjach, w których ma zastosowanie równanie Onsagera, można wykorzystać metodę konduktometryczną nawet przy umiarkowanie niskich stężeniach i nawet w przypadkach równowagi niekwasowej/zasadowej.

Dokumenty standardowe

Niniejsza metoda badawcza opiera się na metodach podanych w źródłach wymienionych w sekcji „Bibliografia” oraz na wstępnym projekcie wytycznych dotyczących zgłoszenia przedprodukcyjnego EPA z 18 sierpnia 1978 r.

METODA – WPROWADZENIE, CEL, ZAKRES, ISTOTNOŚĆ, ZASTOSOWANIE I OGRANICZENIA BADANIA

Dysocjacja substancji w wodzie ma znaczenie dla oceny jej wpływu na środowisko. Określa ona formę substancji, która z kolei determinuje jej zachowanie i transport. Może wpływać na adsorpcję substancji chemicznej na glebach i osadach oraz absorpcję w komórkach biologicznych.

Definicje i jednostki

Dysocjacja to odwracalny proces rozpadu na co najmniej dwa związki chemiczne, które mogą być jonowe. Proces oznacza się na ogół za pomocą wzoru:

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

a stała równowagi stężenia determinująca reakcję to:

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Na przykład w sytuacji gdy R oznacza wodór (substancja jest kwasem), stała wynosi:

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

lub

$$pK_\alpha = pH - \log\frac{[X^-]}{[HX]}$$

Substancje odniesienia

Poniższe substancje odniesienia nie muszą być stosowane za każdym razem, gdy badana jest nowa substancja. Podaje się je przede wszystkim w tym celu, aby okresowo można było wykonać wzorcowanie metody oraz aby umożliwić porównanie wyników w przypadku zastosowania innej metody.

	pK_a ([1])	Temp. w °C
p-Nitrofenol	7,15	251
Kwas benzoesowy	4,12	20
p-Chloroanilina	3,93	20

([1]) Nie są dostępne żadne wartości dla temperatury 20 °C, można jednak przyjąć, że zmienność wyników pomiarów jest wyższa niż oczekiwana zależność od temperatury.

Korzystne byłoby zastosowanie substancji z kilkoma pK, jak wskazano w przedstawionej poniżej zasadzie metody. Taką substancją mógłby być:

Kwas cytrynowy	pK_a (8)	Temp. w °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Zasada metody badawczej

Opisany proces chemiczny jest na ogół tylko nieznacznie zależny od temperatury w zakresie temperatur występujących w środowisku naturalnym. Do wyznaczenia stałej dysocjacji wymagany jest pomiar stężeń zdysocjowanych i niezdysocjowanych form substancji chemicznej. Korzystając z wiedzy o stechiometrii reakcji dysocjacji, o której mowa w sekcji „Definicje i jednostki" powyżej, można wyznaczyć odpowiednią stałą. W konkretnym przypadku opisanym w niniejszej metodzie badawczej substancja zachowuje się jak kwas albo zasada, a najlepszym sposobem na wyznaczenie jest określenie odpowiednich stężeń zjonizowanych i niezjonizowanych form substancji oraz pH roztworu. Zależność między tymi terminami przedstawiono na równaniu dla pK_a w sekcji „Definicje i jednostki" powyżej. Niektóre substancje wykazują więcej niż jedną stałą dysocjacji i możliwe jest opracowanie podobnych równań. Niektóre z metod opisanych w niniejszym dokumencie można również zastosować w odniesieniu do dysocjacji bez użycia kwasów / z użyciem zasad.

Kryteria jakości

Powtarzalność

Stała dysocjacji powinna być powtarzana (minimum trzy oznaczenia) w zakresie ± 0,1 jednostek logarytmicznych.

OPIS PROCEDUR BADAWCZYCH

Istnieją dwa podstawowe podejścia do wyznaczania pK_a. Jedno polega na miareczkowaniu znanej ilości substancji odpowiednio mianowanym roztworem kwasu lub mianowanym roztworem zasady; drugie polega na określeniu względnego stężenia zjonizowanych i niezjonizowanych form oraz jego zależności od pH.

▼M7

Przygotowania

Metody oparte na tych zasadach można zaklasyfikować jako procedury miareczkowe, spektrofotometryczne i konduktometryczne.

Roztwory do badań

W przypadku metody miareczkowej i metody konduktometrycznej substancję chemiczną należy rozpuścić w wodzie destylowanej. W przypadku metody spektrofotometrycznej i innych metod stosuje się roztwory buforowe. Stężenie substancji badanej nie powinno przekraczać niższej spośród następujących wartości: 0,01 M albo połowy stężenia w stanie nasycenia, a do sporządzania roztworów należy stosować najczystszą dostępną formę substancji. Jeżeli substancja jest tylko częściowo rozpuszczalna, można ją rozpuścić w niewielkiej ilości rozpuszczalnika mieszalnego z wodą przed dodaniem do wskazanych powyżej stężeń.

Roztwory należy sprawdzić pod kątem obecności emulsji za pomocą stożka Tyndalla, zwłaszcza jeżeli w celu zwiększenia rozpuszczalności użyto współrozpuszczalnika. W przypadku stosowania roztworów buforowych stężenie buforowe nie powinno przekraczać 0,05 M.

Warunki badania

Temperatura

Należy wyregulować temperaturę do co najmniej ± 1 °C. Preferowana temperatura oznaczenia wynosi 20 °C.

Jeżeli podejrzewa się znaczną zależność od temperatury, oznaczenia należy dokonywać w co najmniej dwóch różnych temperaturach. W takim przypadku temperaturę należy ustawić w odstępach co 10 °C, a regulacja temperatury powinna wynosić ± 0,1 °C.

Analizy

Zastosowana metoda będzie zależała od charakteru badanej substancji. Musi ona być na tyle czuła, aby umożliwić oznaczenie różnych gatunków przy każdym stężeniu roztworu do badań.

Przeprowadzenie badania

Metoda miareczkowa

Roztwór do badań określa się poprzez miareczkowanie odpowiednio mianowanym roztworem zasady lub kwasu, mierząc pH po każdym dodaniu titrantu. Należy przyrostowo dodać titrant co najmniej 10 razy przed osiągnięciem punktu równoważnikowego miareczkowania. Jeżeli równowaga zostanie osiągnięta dostatecznie szybko, można skorzystać z potencjometru rejestrującego. W przypadku tej metody konieczne są dokładne informacje na temat całkowitej ilości substancji i jej stężenia. Należy podjąć środki ostrożności, aby wykluczyć dwutlenek węgla. Szczegółowe informacje na temat procedury, środków ostrożności i obliczeń podano w badaniach standardowych, np. w pozycjach (1), (2), (3), (4) bibliografii.

Metoda spektrofotometryczna

Długość fali ustala się wówczas, gdy zjonizowane i niezjonizowane formy substancji mają wyraźnie różne współczynniki ekstynkcji. Widmo absorpcyjne UV/VIS uzyskuje się z roztworów o stałym stężeniu, w warunkach pH, w których substancja jest zasadniczo niezjonizowana i w pełni zjonizowana, oraz w szeregu pośrednich pH. W tym celu można albo dodawać przyrostowo stężony kwas (stężoną zasadę) do stosunkowo dużej objętości roztworu substancji w wieloskładnikowym roztworze buforowym, początkowo przy wysokim (niskim) pH (pozycja (5) bibliografii), albo dodawać jednakowe objętości roztworu podstawowego substancji w np. wodzie czy metanolu do stałych objętości różnych roztworów buforowych obejmujących pożądany zakres pH. Na podstawie wartości pH i absorbancji przy wybranej długości fali oblicza się wystarczającą liczbę wartości dla pK_a, korzystając z danych uzyskanych przy co najmniej 5 pH, w których substancja jest zjonizowana w co najmniej 10 % i mniej niż 90 %. Więcej informacji szczegółowych na temat doświadczenia i metodę obliczania można znaleźć w pozycji (1) bibliografii.

▼M7

Metoda konduktometryczna

Przy użyciu komórki o niskiej znanej stałej komórkowej mierzy się przewodność roztworu substancji o stężeniu około 0,1 M w wodzie do pomiarów przewodności. Mierzy się także przewodność szeregu dokładnie wykonanych rozcieńczeń tego roztworu. Za każdym razem stężenie zmniejsza się o połowę, a serie powinny obejmować co najmniej rząd wielkości stężenia. Przewodność graniczną przy rozcieńczeniu nieskończenie wielkim ustala się, przeprowadzając podobne doświadczenie z użyciem soli sodowej, a następnie dokonując ekstrapolacji. Stopień dysocjacji można wówczas obliczyć na podstawie przewodności każdego roztworu za pomocą równania Onsagera i stąd stałą dysocjacji można obliczyć zgodnie z prawem rozcieńczeń Ostwalda jako $K = \alpha^2C/(1 - \alpha)$, gdzie C oznacza stężenie w molach na litr, a α oznacza frakcję zdysocjowaną. Należy podjąć środki ostrożności, aby wykluczyć CO_2. Więcej informacji szczegółowych na temat doświadczenia i metodę obliczania można znaleźć w standardowej literaturze i pozycjach (1), (6) i (7) bibliografii.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

Metoda miareczkowa

Wartość pK_a oblicza się dla 10 punktów mierzonych na krzywej miareczkowania. Oblicza się średnią i odchylenie standardowe takich wartości pK_a. Należy je przestawić na wykresie zestawiającym pH z objętością mianowanego roztworu zasady lub kwasu oraz w postaci tabeli.

Metody spektrofotometryczne

Absorbancję i pH zestawia się w tabeli dla każdego widma. Na podstawie pośrednich punktów danych widma oblicza się co najmniej pięć wartości pK_a, a także średnią i odchylenie standardowe tych wyników.

Metoda konduktometryczna

Przewodność równoważnikową Λ oblicza się dla każdego stężenia kwasu i dla każdego stężenia mieszaniny złożonej z jednego równoważnika kwasu oraz równoważnika wodorotlenku sodu niezawierającego węglanów w ilości 0,98. Kwas jest w nadmiarze, aby zapobiec nadmiarowi OH^- w wyniku hydrolizy. $1/\Lambda$ zestawia się na wykresie z $\sqrt{C}$, a Λ_o soli można otrzymać przez ekstrapolację do stężenia zerowego.

Λ_o kwasu można obliczyć, korzystając z dostępnych w literaturze wartości H^+ i Na^+. Wartość pK_a można wyliczyć ze wzoru $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ i $K_a = \alpha^2C/(1 - \alpha)$ dla każdego stężenia. Lepsze wartości Ka można uzyskać, dokonując korekt o ruchliwość i aktywność. Należy obliczyć średnią i odchylenia standardowe wartości pK_a.

Sprawozdanie z badania

Wszystkie dane pierwotne i obliczone wartości pK_a należy przedłożyć wraz z metodą obliczania (najlepiej w formie tabeli, jak zasugerowano w pozycji (1) bibliografii), podobnie jak opisane powyżej parametry statystyczne. W przypadku metod miareczkowych należy przedstawić szczegółowe informacje na temat mianowania titrantów.

W przypadku metody spektrofotometrycznej należy przedstawić wszystkie widma. W przypadku metody konduktometrycznej należy przedstawić szczegółowe informacje na temat wyznaczania stałej komórkowej. Należy przedstawić informacje na temat zastosowanej techniki, metod analitycznych i charakteru wszelkich wykorzystywanych roztworów buforowych.

Należy podać temperaturę(-y) przeprowadzania badania.

BIBLIOGRAFIA

(1) Albert, A. i Sergeant, E.P.: Ionization Constants of Acids and Bases, Wiley, Inc., Nowy Jork, 1962.

▼**M7**

(2) Nelson, N.H. i Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, s. 1186–1188 (1969).

(3) ASTM D 1293 – Annual ASTM Standards, Filadelfia, 1974.

(4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, wydanie 14., Amerykańskie Stowarzyszenie Zdrowia Publicznego, Waszyngton, 1976.

(5) Clark, J. i Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (Londyn) 281, (marzec 1973 r.).

(6) ASTM D 1125 – Annual ASTM Standards, Filadelfia, 1974.

(7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (zob. Powyżej (4)).

(8) *Handbook of Chemistry and Physics,* wydanie 60. CRC-Press, Boca Raton, Floryda, 33431 (1980).

▼B

CZĘŚĆ B: METODY OZNACZANIA TOKSYCZNOŚCI I INNYCH SKUTKÓW ZDROWOTNYCH

SPIS TREŚCI

WPROWADZENIE OGÓLNE

B.1 bis. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA POKARMOWA – PROCEDURA Z WYKORZYSTANIEM STAŁEJ DAWKI

B.1 ter. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA POKARMOWA – METODA KLAS OSTREJ TOKSYCZNOŚCI

B.2. OSTRA TOKSYCZNOŚĆ INHALACYJNA

B.3. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA (DERMALNA)

B.4. OSTRE DZIAŁANIE DRAŻNIĄCE/ŻRĄCE NA SKÓRĘ

B.5. DZIAŁANIE ŻRĄCE / SILNIE DRAŻNIĄCE NA OCZY

B.6. SENSYBILIZACJA SKÓRY

B.7. 28-DNIOWE BADANIE TOKSYCZNOŚCI DOUSTNEJ WYWOŁANEJ POWTARZANYM DAWKOWANIEM U GRYZONI

B.8. TOKSYCZNOŚĆ PODOSTRA – NARAŻENIE INHALACYJNE: BADANIE 28-DNIOWE

B.9. TOKSYCZNOŚĆ POWTARZANEJ (28 DNI) DAWKI (DERMALNA)

B.10. BADANIE ABERRACJI CHROMOSOMOWEJ W KOMÓRKACH SSAKÓW *IN VITRO*

B.11. TEST ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH NA SZPIKU KOSTNYM SSAKÓW

B.12. TEST MIKROJĄDROWY NA ERYTROCYTACH SSAKÓW

B.13/14. MUTAGENNOŚĆ: BADANIE MUTACJI POWROTNYCH W KOMÓRKACH BAKTERYJNYCH

B.17. TESTY MUTACJI GENOWYCH NA KOMÓRKACH SSAKÓW *IN VITRO* Z WYKORZYSTANIEM GENÓW HPRT I XPRT

B.21. BADANIE PRZEMIANY KOMÓRKOWEJ SSAKÓW *IN VITRO*

B.22. BADANIE DOMINUJĄCEGO GENU LETALNEGO GRYZONIA

▼B

B.23.	BADANIE ABERRACJI CHROMOSOMOWEJ SPERMATOGONIÓW U SSAKÓW
B.25.	TRANSLOKACJA DZIEDZICZNOŚCI U MYSZY
B.26.	BADANIE TOKSYCZNOŚCI PODPRZEWLEKŁEJ DROGĄ POKARMOWĄ – STUDIUM TOKSYCZNOŚCI NA GRYZONIACH METODĄ POWTARZANEJ 90-DNIOWEJ DAWKI DROGĄ POKARMOWĄ
B.27.	BADANIE TOKSYCZNOŚCI PODPRZEWLEKŁEJ DROGĄ POKARMOWĄ – BADANIA TOKSYCZNOŚCI NA NIEGRYZONIACH METODĄ POWTARZANEJ 90-DNIOWEJ DAWKI DROGĄ POKARMOWĄ
B.28.	BADANIE PODCHRONICZNEJ TOKSYCZNOŚCI SKÓRY – 90-DNIOWE BADANIA POWTARZANEGO DAWKOWANIA NA SKÓRZE Z WYKORZYSTANIEM GATUNKÓW GRYZONI
B.29.	TOKSYCZNOŚĆ PODPRZEWLEKŁA – NARAŻENIE INHALACYJNE: BADANIE 90-DNIOWE
B.30.	BADANIA TOKSYCZNOŚCI PRZEWLEKŁEJ
B.31.	BADANIE PRZEDURODZENIOWEJ TOKSYCZNOŚCI ROZWOJOWEJ
B.32.	BADANIA RAKOTWÓRCZOŚCI
B.33.	ŁĄCZONE BADANIA TOKSYCZNOŚCI PRZEWLEKŁEJ/RAKOTWÓRCZOŚCI
B.34.	BADANIE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCJI JEDNEGO POKOLENIA
B.35.	DWUPOKOLENIOWE BADANIE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCYJNEJ
B.36.	TOKSYKOKINETYKA
B.37.	OPÓŹNIONA NEUROTOKSYCZNOŚĆ SUBSTANCJI FOSFOROORGANICZNYCH PO DUŻEJ EKSPOZYCJI
B.38.	OPÓŹNIONA NEUROTOKSYCZNOŚĆ SUBSTANCJI FOSFOROORGANICZNYCH – 28-DNIOWE BADANIE WIELOKROTNEJ DAWKI
B.39.	TEST POREPERACYJNEJ SYNTEZY DNA Z KOMÓRKAMI WĄTROBY SSAKÓW *IN VIVO*
B.40.	BADANIE DZIAŁANIA ŻRĄCEGO NA SKÓRĘ METODĄ *IN VITRO*: TEST PRZEZSKÓRNEJ OPORNOŚCI ELEKTRYCZNEJ
B.40 bis.	BADANIE DZIAŁANIA ŻRĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO*: METODA BADAWCZA Z UŻYCIEM ZREKONSTRUOWANEGO LUDZKIEGO NASKÓRKA
B.41.	BADANIE FOTOTOKSYCZNOŚCI 3T3 NRU IN VITRO
B.42.	DZIAŁANIE UCZULAJĄCE NA SKÓRĘ: BADANIE LOKALNYCH WĘZŁÓW CHŁONNYCH

▼B

B.43. BADANIE NEUROTOKSYCZNOŚCI U GRYZONI

B.44. ABSORPCJA PRZEZ SKÓRĘ: METODA *IN VIVO*

B.45. ABSORPCJA PRZEZ SKÓRĘ: METODA *IN VITRO*

B.46. BADANIE DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO*: METODA BADANIA Z UŻYCIEM ZREKONSTRUOWANEGO LUDZKIEGO NASKÓRKA

B.47. METODA BADANIA ZMĘTNIENIA I PRZEPUSZCZALNOŚCI ROGÓWKI U BYDŁA DO CELÓW IDENTYFIKACJI (I) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH POWODUJĄCYCH POWAŻNE USZKODZENIE OCZU ORAZ (II) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH, KTÓRE NIE WYMAGAJĄ ZAKLASYFIKOWANIA JAKO SUBSTANCJE DRAŻNIĄCE OCZY LUB POWODUJĄCE POWAŻNE USZKODZENIE OCZU

B.48. METODA BADANIA NA IZOLOWANYM OKU KURZYM DO CELÓW IDENTYFIKACJI (I) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH POWODUJĄCYCH POWAŻNE USZKODZENIE OCZU ORAZ (II) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH, KTÓRE NIE WYMAGAJĄ ZAKLASYFIKOWANIA JAKO SUBSTANCJE DRAŻNIĄCE OCZY LUB POWODUJĄCE POWAŻNE USZKODZENIE OCZU

B.49. TEST MIKROJĄDROWY NA KOMÓRKACH SSAKÓW *IN VITRO*

B.50. TEST MIKROJĄDROWY NA KOMÓRKACH SSAKÓW *IN VITRO*

B.51. DZIAŁANIE UCZULAJĄCE NA SKÓRĘ: BADANIE LOKALNYCH WĘZŁÓW CHŁONNYCH BRDU-ELISA

B.52. OSTRA TOKSYCZNOŚĆ INHALACYJNA – METODA KLAS OSTREJ TOKSYCZNOŚCI

B.53. BADANIE NEUROTOKSYCZNOŚCI ROZWOJOWEJ

B.54. TEST BIOLOGICZNY WZROSTU MACICY U GRYZONI: KRÓTKOTERMINOWE BADANIE PRZESIEWOWE WŁAŚCIWOŚCI ESTROGENNYCH

B.55. TEST BIOLOGICZNY HERSHBERGERA NA SZCZURACH: KRÓTKOTERMINOWE BADANIE PRZESIEWOWE WŁAŚCIWOŚCI (ANTY)ANDROGENNYCH

B.56. ROZSZERZONE BADANIE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCYJNEJ JEDNEGO POKOLENIA

B.57. TEST STEROIDOGENEZY H295R

B.58. BADANIE MUTACJI GENOWEJ KOMÓREK SOMATYCZNYCH I GERMINALNYCH U GRYZONI TRANSGENICZNYCH

B.59. DZIAŁANIE UCZULAJĄCE NA SKÓRĘ *IN CHEMICO*: BEZPOŚREDNIE OZNACZANIE REAKTYWNOŚCI PEPTYDÓW (DPRA)

B.60. BADANIE DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO*: METODA BADAWCZA Z WYKORZYSTANIEM LUCYFERAZY ARE-NRF2

B.61. METODA BADANIA PRZECIEKU FLUORESCEINY DO CELÓW IDENTYFIKACJI SUBSTANCJI ŻRĄCYCH I SILNIE DRAŻNIĄCYCH DLA OCZU

B.62. TEST KOMETOWY NA SSAKACH W ŚRODOWISKU ZASADOWYM *IN VIVO*

▼B

B.63. BADANIE KLASYFIKACYJNE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCYJNEJ I ROZWOJOWEJ

B.64. POŁĄCZONE BADANIE Z UŻYCIEM DAWKI POWTARZANEJ I BADANIE KLASYFIKACYJNE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCYJNEJ/ROZWOJOWEJ

B.65. METODA BADAWCZA BARIERY MEMBRANOWEJ *IN VITRO* W PRZYPADKU DZIAŁANIA ŻRĄCEGO NA SKÓRĘ

B.66. STABILNIE TRANSFEKOWANA TRANSAKTYWACJA W BADANIACH *IN VITRO* DO WYKRYWANIA AGONISTÓW i ANTAGONISTÓW RECEPTORA ESTROGENOWEGO

B.67. TESTY MUTACJI GENOWYCH NA KOMÓRKACH SSAKÓW *IN VITRO* Z WYKORZYSTANIEM GENU KINAZY TYMIDYNOWEJ

B.68. METODA BADAWCZA IN VITRO KRÓTKIEGO OKRESU NARAŻENIA DO CELÓW IDENTYFIKACJI i) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH POWODUJĄCYCH POWAŻNE USZKODZENIE OCZU ORAZ ii) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH, KTÓRE NIE WYMAGAJĄ ZAKLASYFIKOWANIA JAKO SUBSTANCJE DRAŻNIĄCE OCZY LUB POWODUJĄCE POWAŻNE USZKODZENIE OCZU.

B.69. METODA BADAWCZA WYKORZYSTYWANA W RAMACH BADANIA NA MODELU ZREKONSTRUOWANEGO LUDZKIEGO NABŁONKA PRZYPOMINAJĄCEGO ROGÓWKĘ (RhCE) STOSOWANA DO IDENTYFIKACJI SUBSTANCJI CHEMICZNYCH NIEWYMAGAJĄCYCH KLASYFIKACJI I OZNAKOWANIA POD WZGLĘDEM DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO NA OCZY LUB POWAŻNYCH USZKODZEŃ OCZU

B.70. TESTY *IN VITRO* LUDZKIEGO REKOMBINOWANEGO RECEPTORA ESTROGENOWEGO (hrER) MAJĄCE NA CELU WYKRYCIE SUBSTANCJI CHEMICZNYCH WYKAZUJĄCYCH POWINOWACTWO WIĄZANIA RECEPTORA ESTROGENOWEGO

B.71. TESTY DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO* DOTYCZĄCE KLUCZOWEGO ZDARZENIA AKTYWACJI KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH W MECHANIZMIE WYWOŁYWANIA SKUTKÓW SZKODLIWYCH W ZAKRESIE DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ

▼B

WPROWADZENIE OGÓLNE

A. CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI TESTOWANEJ

Skład substancji testowanej, w tym główne zanieczyszczenia oraz jej istotne właściwości fizyko-chemiczne włącznie z trwałością, powinny być znane przed rozpoczęciem każdego badania toksyczności.

Właściwości fizyko-chemiczne substancji testowanej dostarczają ważnych informacji przy wyborze drogi aplikowania, projektowaniu każdego poszczególnego badania oraz posługiwaniu się i przechowywaniu substancji testowanej.

Rozpoczęcie badania powinno poprzedzać zastosowanie metody analitycznej w celu jakościowego i ilościowego oznaczenia substancji testowanej (wraz z głównymi zanieczyszczeniami, jeżeli możliwe) w ośrodku dawkującym i materiale biologicznym.

Wszystkie informacje dotyczące identyfikacji, właściwości fizyko-chemicznych, czystości i zachowania substancji testowanej powinny być zawarte w sprawozdaniu z testu.

B. UTRZYMANIE ZWIERZĄT

Rygorystyczna kontrola warunków otoczenia i właściwe techniki utrzymania zwierząt są niezbędne przy testowaniu toksyczności.

(i) *Warunki, w których przebywają zwierzęta*

Warunki otoczenia w pomieszczeniach dla zwierząt doświadczalnych i zagrodach powinny być odpowiednie dla badanego gatunku. Odpowiednimi warunkami dla szczurów, myszy i świnek morskich są: temperatura pokojowa wynosząca 22 ^{o}C ± 3 ^{o}C i wilgotność względna 30–70 %; dla królików temperatura powinna wynosić 20 ^{o}C ± 3 ^{o}C przy wilgotności względnej 30–70 %.

Niektóre techniki eksperymentalne są szczególnie wrażliwe na wpływ temperatury i w takich przypadkach szczegóły odpowiednich warunków są zawarte w opisie metody badania. We wszystkich badaniach działania toksycznego temperatura i wilgotność powinny być monitorowane, rejestrowane i zawarte w końcowym sprawozdaniu z badania.

Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin jasno, 12 godzin ciemno. Szczegóły form oświetlenia powinny być rejestrowane i zawarte w końcowym sprawozdaniu z badania.

Przy braku innych wskazań w danej metodzie zwierzęta mogą być umieszczane pojedynczo, lub umieszczane w klatkach w małych grupach o tej samej płci; w przypadku umieszczania grupowego, nie więcej niż pięć zwierząt powinno być umieszczanych w jednej klatce.

W sprawozdaniach z eksperymentów na zwierzętach, ważne jest wskazanie stosowanego typu umieszczania zwierząt w klatkach i liczby zwierząt umieszczanych w każdej klatce zarówno podczas ekspozycji na związek chemiczny, jak i w późniejszym okresie obserwacji.

▼B

(ii) *Warunki żywienia*

Diety powinny w pełni spełniać zapotrzebowanie pokarmowe gatunku poddanego testowi. W przypadkach gdy substancje testowane są podawane zwierzętom w ich pożywieniu, wartość pokarmowa może być zredukowana przez interakcję tej substancji ze składnikiem pokarmowym. Możliwość takiej reakcji powinna być rozważona przy interpretacji wyników testów. Konwencjonalne diety laboratoryjne mogą być stosowane przy nieograniczonym dostarczaniu wody pitnej. Na wybór diety może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej domieszki substancji testowanej przy podawaniu powyższą metodą.

Pokarmowe substancje zanieczyszczające, o których wiadomo, że wpływają na toksyczność, nie powinny być obecne w stężeniach przeszkadzających.

C. **TESTOWANIE ALTERNATYWNE**

Unia Europejska jest zaangażowana w promowanie rozwijania i zatwierdzania technik alternatywnych, które mogą dostarczyć ten sam poziom informacji jak obecne testy na zwierzętach, ale które stosują mniej zwierząt, powodują mniejsze cierpienie lub całkowicie unikają wykorzystania zwierząt.

Takie metody, w przypadku gdy staną się dostępne, muszą być rozważane, gdziekolwiek jest to możliwe, przy charakteryzowaniu zagrożenia i późniejszym klasyfikowaniu i etykietowaniu wewnętrznych zagrożeń.

D. **OCENA I INTERPRETACJA**

Podczas oceny i interpretacji testów, muszą być rozważone ograniczenia zakresu, w którym wyniki badań na zwierzętach i *in vitro* mogą być odniesione bezpośrednio do człowieka i dlatego tam, gdzie dostępne są dowody niekorzystnych skutków dla ludzi, mogą one być użyte do potwierdzenia wyników testowania.

D. **BIBLIOGRAFIA**

Większość tych metod jest opracowana w ramach programu OECD – wskazówki dotyczące testowania, i powinny być one realizowane zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej, aby zapewnić możliwie najszerszą „wzajemną akceptację danych”.

Dodatkowe informacje mogą być odnalezione w bibliografii wskazówek OECD i odpowiedniej literaturze publikowanej w innych źródłach.

▼B

B.1 bis. **TOKSYCZNOŚĆ OSTRA POKARMOWA – PROCEDURA Z WYKORZYSTANIEM STAŁEJ DAWKI**

1. **METODA**

Niniejsza metoda jest kopią OECD TG 420 (2001)

1.1. WPROWADZENIE

Tradycyjne metody oceny ostrej toksyczności wykorzystują śmierć zwierząt jako punkt końcowy. W 1984 r. Brytyjskie Towarzystwo Toksykologiczne zaproponowało nowe podejście do określania ostrej toksyczności, oparte na podawaniu serii dawek o stałym stężeniu (1). To podejście umożliwia uniknięcie śmierci zwierząt jako punktu końcowego, wykorzystując jako alternatywę obserwacje wyraźnych objawów zatrucia na danym etapie podawania serii dawek o stałym stężeniu. W następstwie badań weryfikacyjnych *in vivo*, przeprowadzonych przez Zjednoczone Królestwo (2) oraz na szczeblu międzynarodowym (3), procedura ta została przyjęta jako metoda badawcza w 1992 r. Jednocześnie, wykorzystując w szeregu badań modele matematyczne, poddano ocenie właściwości statystyczne Procedury stałych dawek (4)(5)(6). Zarówno badania *in vivo*, jak i badania z wykorzystaniem modeli wykazały, że procedura ta jest powtarzalna, wymaga mniejszej liczby zwierząt i powoduje mniej cierpień niż metody tradycyjne oraz że możliwa jest dzięki niej ocena substancji w podobny sposób, jak to ma miejsce z wykorzystaniem innych metod.

Wytyczne dotyczące wyboru najbardziej odpowiedniej metody badawczej dla indywidualnych przypadków zostały zamieszczone w Wytycznych dotyczących badania ostrej toksyczności drogą pokarmową (7). Wytyczne te zawierają także dodatkowe informacje na temat przeprowadzania i interpretacji metody badawczej B.1 bis.

Zasadniczo w badaniu głównym z wykorzystaniem niniejszej metody stosuje się jedynie umiarkowane toksycznie dawki oraz unika się dawek mogących spowodować śmierć. Nie jest również konieczne podawanie dawek mogących powodować silny ból lub stres wynikający z działania żrącego lub podrażniającego. Zwierzęta w stanie agonalnym lub w oczywisty sposób cierpiące albo chore i przeżywające strach powinny zostać uśmiercone w humanitarny sposób i uwzględniane w interpretacji wyników badań jako zwierzęta padłe w trakcie badania. Kryteria podejmowania decyzji co do uśmiercenia zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących ból oraz wytyczne dotyczące rozpoznania przewidywanego lub zbliżającego się zgonu są zawarte w oddzielnych Wytycznych (8).

Metoda umożliwia przedstawienie informacji na temat niebezpiecznych właściwości danej substancji i pozwala na ocenę i klasyfikację zgodną z Globalnym Zharmonizowanym Systemem (GHS) klasyfikującym związki chemiczne pod względem ich ostrej toksyczności (9).

Laboratorium badawcze powinno uwzględnić wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji przed rozpoczęciem badań. Informacje te powinny obejmować nazwę i budowę chemiczną substancji; właściwości fizyko-chemiczne; wyniki innych badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*; dane dotyczące toksyczności substancji zbliżonych pod względem budowy; przewidywane zastosowanie (zastosowania) tej substancji. Informacje te są niezbędne celem spełnienia wszelkich wymogów dotyczących ochrony zdrowia ludzkiego, i pomocne w wyborze odpowiedniej dawki wyjściowej.

▼B

1.2. DEFINICJE

Toksyczność ostra pokarmowa: oznacza niepożądane skutki pojawiające się w następstwie podania doustnego pojedynczej dawki substancji lub wielu dawek w okresie 24 godzin.

Opóźniona śmierć: oznacza, że zwierzę nie umiera, ani nie wydaje się być w agonii przez 48 godzin, lecz pada później w 14-dniowym okresie obserwacyjnym.

Dawka: oznacza ilość podawanej substancji badanej. Dawka jest wyrażana jako masa próbki na jednostkę masy zwierzęcia (np. mg/kg).

Wyraźne działanie toksyczne: jest ogólnym terminem opisującym wyraźne objawy zatrucia występujące w następstwie podania substancji badanej (zob. (3) celem uzyskania przykładów), pozwalające oczekiwać, że u większości zwierząt następna najwyższa stała dawka spowoduje bądź silny ból, przewlekłe oznaki strachu, stan agonalny (kryteria są przedstawione w Wytycznych dotyczących humanitarnego punktu końcowego (8)), bądź zgon u większości badanych zwierząt.

GHS: Globalny zharmonizowany system klasyfikacji substancji i mieszanin chemicznych. Połączone działania OECD (w dziedzinie zdrowia ludzkiego i ochrony środowiska), Komitetu Ekspertów ONZ w sprawie transportu towarów niebezpiecznych (w zakresie właściwości fizyko-chemicznych) i Międzynarodowej Organizacji Pracy (ILO) (w zakresie wymiany informacji na temat niebezpieczeństw), koordynowane w ramach Międzyorganizacyjnego programu na rzecz właściwego zarządzania związkami chemicznymi (IOMC).

Zagrażająca śmierć: występuje w przypadku gdy przewiduje się wystąpienie stanu agonalnego lub śmierci przed następnym zaplanowanym czasem obserwacji. Objawy wskazujące na ten stan mogą obejmować u gryzonia konwulsje, ułożenie na boku, pozycja leżąca oraz drgawki (zob. Wytyczne dotyczące humanitarnego punktu końcowego (9) celem uzyskania szczegółowych informacji).

LD_{50} (średnia dawka śmiertelna): jest statystycznie wyprowadzoną pojedynczą dawką substancji, która powoduje zgon 50 % zwierząt przy podaniu drogą pokarmową. Wartość LD_{50} jest wyrażona w wadze substancji badanej na jednostkę masy badanego zwierzęcia (mg/kg).

Dawka graniczna: oznacza górną dawkę graniczną w badaniach (2 000 lub 5 000 mg/kg).

Stan agonalny: stan śmierci lub niezdolności do przeżycia nawet w przypadku zastosowania leczenia (zob. Wytyczne dotyczące humanitarnego punktu końcowego (8) w celu uzyskania danych szczegółowych).

Przewidywalna śmierć: obecność objawów klinicznych wskazujących na nadchodzący zgon przed planowanym zakończeniem eksperymentu, na przykład: niezdolność do dotarcia do wody lub pożywienia (zob. Wytyczne dotyczące humanitarnego punktu końcowego ([8]) w celu uzyskania danych szczegółowych).

▼B

1.3. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Grupom zwierząt tej samej płci podaje się, zgodnie z procedurą stopniową, stałe dawki na poziomie 5, 50, 300 i 2 000 mg/kg (w wyjątkowych wypadkach można rozważyć podanie dodatkowej stałej dawki wynoszącej 5 000 mg/kg, zob. sekcja 1.6.2). Poziom pierwszej stałej dawki jest określany na podstawie badania poglądowego na poziomie, który spowoduje wystąpienie określonych objawów zatrucia, lecz nie spowoduje ciężkich zatruć lub śmierci. Objawy kliniczne oraz objawy kojarzone z bólem, cierpieniem i zbliżającą się śmiercią zostały opisane w oddzielnych Wytycznych OECD (8). Następnej grupie zwierząt może zostać podana wyższa bądź niższa stała dawka, w zależności od obecności lub braku objawów zatrucia lub śmiertelności. Taka procedura jest powtarzana aż do osiągnięcia dawki powodującej wyraźne zatrucie lub powodującej nie więcej niż jeden przypadek śmiertelny, lub w przypadku braku skutków w następstwie podania najwyższej dawki, bądź w przypadku zgonu przy najniższej dawce.

1.4. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.4.1. **Wybór gatunków zwierząt**

Preferowanym gatunkiem gryzonia jest szczur, choć dopuszcza się wykorzystywanie innych gatunków gryzoni. Na ogół w doświadczeniach wykorzystuję się samice (7). Wynika to z faktu, znajdującego swoje potwierdzenie w literaturze dotyczącej konwencjonalnych badań LD_{50}, że różnice między płciami są znikome, lecz tam gdzie występują, samice są z reguły nieznacznie bardziej wrażliwe (10). Jednakże jeżeli wiedza na temat właściwości toksykologicznych i toksykokinetycznych związków o pokrewnej budowie wskazuje, że samce mogą być bardziej wrażliwe, w takim przypadku należy wybrać do badania tę płeć. Jeżeli badanie jest przeprowadzane na samcach, należy podać uzasadnienie.

Zaleca się wykorzystanie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt pochodzących ze szczepów na ogół wykorzystywanych w laboratorium. Samice powinny być bezdzietne i nieciężarne. Każde zwierzę na początku cyklu laboratoryjnego powinno być w wieku między 8 a 12 tygodniem, a jego masa nie powinna przekraczać lub być mniejsza o ± 20 % średniej masy wszystkich wykorzystywanych uprzednio zwierząt.

1.4.2. **Warunki przebywania i warunki żywieniowe**

Temperatura w badawczych pomieszczeniach hodowlanych powinna wynosić 22° C (±3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin jasno, 12 godzin ciemno. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Zwierzęta mogą być grupowane w klatkach w sposób nieograniczający łatwej obserwacji pojedynczych sztuk.

1.4.3. **Przygotowanie zwierząt**

Zwierzęta są wybierane losowo, oznaczane w sposób umożliwiający identyfikację poszczególnych osobników, i przetrzymywane w swoich klatkach przynajmniej przez 5 dni przed podaniem pierwszej dawki, co umożliwia aklimatyzację do warunków laboratoryjnych.

▼B

1.4.4. **Przygotowanie dawek**

Na ogół badana substancja powinna być podawana w dawkach o stałej objętości przy zmianie stężenia dawkowanego preparatu. Jednakże w przypadku badania końcowego produktu będącego cieczą lub mieszaniny, dla celów oceny niebezpiecznego działania tej substancji, bardziej stosowne może okazać się wykorzystanie substancji nierozcieńczonej. tj. substancji o stałym stężeniu. Wymóg ten może być ponadto określony w niektórych przepisach wykonawczych. W żadnym razie niedopuszczalne jest przekroczenie maksymalnej objętości przewidzianej do podania. Maksymalna objętość cieczy podanej jednorazowo zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Dla gryzoni objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała: jednakże w przypadku roztworów wodnych dopuszczalne jest przyjęcie dawki 2 ml/100 g masy ciała. Jeżeli chodzi o przygotowywanie dozowanego preparatu, należy użyć, o ile to możliwe, roztworów/zawiesin/emulsji wodnych, następnie rozważyć przygotowanie roztworów/zawiesin/emulsji w oleju (np. oleju kukurydzianym), a dopiero w następnej kolejności roztworów innych nośników. W przypadkach stosowania nośnika różnego od wody muszą być znane jego właściwości toksykologiczne. Dawki muszą być przygotowywane na krótko przed podaniem, chyba że stabilność przygotowanego preparatu w okresie w jakim ma on być stosowany jest znana i możliwa do przyjęcia.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Podawanie dawki**

Substancja badana jest podawana w formie pojedynczej dawki przez zgłębnik przy użyciu sondy przełykowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. W nietypowych przypadkach, gdy niemożliwe jest podanie pojedynczej dawki, jednorazowa dawka może zostać rozbita na mniejsze porcje i podawana w odstępach czasowych w okresie nieprzekraczającym 24 godzin.

Zwierzęta powinny być wyposzczone przed podaniem dawki (np. szczurom należy wstrzymać podawanie jedzenia przez noc, lecz nie wstrzymywać wody, myszom należy wstrzymać jedzenie przez 3–4 godziny, lecz nie wstrzymywać wody). Następnie, po wyposzczeniu, zwierzęta należy zważyć oraz podać im substancję badaną. W przypadku szczurów, po podaniu substancji badanej można wstrzymać podawanie jedzenia przez 3–4 godziny, a w przypadku myszy przez 1–2 godziny. Jeżeli dawka jest podawana porcjami przez określony czas, może być konieczne podanie pokarmu i wody w zależności od długości okresu podawania dawki.

1.5.2. **Badania poglądowe**

Celem badań poglądowych jest wybranie odpowiedniej dawki początkowej dla badań zasadniczych. Substancja badana jest podawana poszczególnym zwierzętom w sposób sekwencyjny, zgodnie ze schematem postępowania zawartym w załączniku 1. Badania poglądowe są przerywane, gdy możliwe jest podjęcie decyzji co do ilości dawki wyjściowej (lub następuje śmierć w wyniku podania najmniejszej stałej dawki).

Dawka początkowa wyznaczona do badania poglądowego danej substancji jest wybierana w oparciu o dane eksperymentalne z badań *in vivo* i *in vitro* tej samej substancji lub substancji pokrewnych pod względem budowy, spośród stałych dawek określonych na poziomie 5, 50, 300, i 2 000 mg/kg, jako dawka, która powinna wywołać wyraźną toksyczność. W przypadku braku danych na temat takich substancji należy ustalić dawkę wyjściową na poziomie 300 mg/kg.

Dopuszczalna jest nie krótsza niż 24-godzinna przerwa w podawaniu dawki jednemu zwierzęciu. Wszystkie zwierzęta należy objąć obserwacją przez przynajmniej 14 dni.

▼B

W wyjątkowych okolicznościach i wyłącznie jeżeli wymagają tego określone potrzeby regulacyjne, można rozważyć podanie dawki dodatkowej stałej na górnym poziomie 5 000 mg/kg (zob. załącznik 3). Z uwagi na dobrostan zwierząt badania na zwierzętach w zakresie kategorii 5 GSH (2 000 i 5 000 mg/kg) są odradzane i powinny być rozważane wyłącznie w przypadku znacznego prawdopodobieństwa, że wyniki takich badań przyniosą bezpośrednie korzyści dla ochrony zdrowia ludzkiego, zwierząt lub środowiska naturalnego.

W przypadku gdy zwierzę, któremu w badaniach poglądowych została podana najniższa stała dawka (5 mg/kg), ginie, normalną procedurą jest przerwanie badań i przypisanie substancji do kategorii 1 GSH (jak to przedstawiono w załączniku 1). Jednakże w przypadku gdy wymagane jest potwierdzenie klasyfikacji wstępnej, możliwe jest przeprowadzenie procedury dodatkowej, zgodnie z poniższym opisem. Drugie zwierzę otrzymuje dawkę 5 mg/kg. Jeżeli również ono pada, przypisanie do kategorii 1 GHS zostaje potwierdzone, a badanie zostaje natychmiastowo przerwane. Jeżeli drugie zwierzę przeżyje, dawkę 5 mg/kg podaje się maksymalnie trzem kolejnym zwierzętom. Z uwagi na wysokie ryzyko śmiertelności dawki powinny być podawane sekwencyjnie, co zapewni optymalną ochronę zwierząt. Przerwy w podawaniu dawek każdemu zwierzęciu powinny pozwalać na uzyskanie pewności, że poprzednie zwierzę przeżyje. W momencie wystąpienia drugiego przypadku śmiertelnego sekwencyjne podawanie dawek zostaje natychmiast przerwane, a podawanie dawek kolejnym zwierzętom wstrzymane. Ponieważ wystąpienie drugiego przypadku śmiertelnego (niezależnie od liczby zwierząt poddanych badaniu do momentu ich przerwania) mieści się w wyniku A (2 lub więcej przypadków śmiertelnych), stosowana jest zasada klasyfikacji określona w załączniku 2, zgodnie z którą stężenie stałej dawki wynosi 5 mg/kg. Dodatkowo, do momentu przyjęcia nowego GHS, obowiązujące są wytyczne zawarte w załączniku 4, dotyczące klasyfikacji substancji w ramach systemu WE.

1.5.3. **Badania zasadnicze**

1.5.3.1. *Liczba zwierząt i poziomy dawek*

Działania, jakie mają być podjęte w następstwie przeprowadzenia badań przy pomocy dawek wyjściowych, są przedstawione na schemacie postępowania zawartym w załączniku 2. Wymagany jest jeden z trzech schematów postępowania; bądź przerwanie testów i przypisanie do jednej z klas klasyfikacji niebezpieczeństwa, zbadanie zwierzęcia przy pomocy wyższej stałej dawki, bądź jego zbadanie przy pomocy niższej stałej dawki. Jednakże w celu ochrony zwierząt poziom, który spowodował śmierć zwierzęcia w trakcie badań poglądowych, nie będzie powtórnie wykorzystany w badaniach zasadniczych (zob. załącznik 2). Doświadczenie wykazuje, że najbardziej prawdopodobny wynik na poziomie wyjściowym stałej dawki umożliwi klasyfikację substancji, skutkiem czego nie będą konieczne dalsze badania.

Normalnie wykorzystuje się ogólną liczbę pięciu zwierząt jednej płci dla każdego badanego poziomu dawki. Liczba ta obejmuje jedno zwierzę zbadane w trakcie badań poglądowych przy pomocy wybranej dawki oraz cztery inne zwierzęta (z wyjątkiem sytuacji, w których poziom dawki wykorzystanej w badaniach zasadniczych nie był wcześniej zastosowany w badaniach poglądowych).

Odstępy między podawaniem dawek na każdym poziomie określa się na podstawie czasu wystąpienia, długości trwania i dokuczliwości objawów zatrucia. Podanie zwierzęciu następnej dawki powinno zostać opóźnione do momentu uzyskania pewności co do możliwości przeżycia zwierząt, którym podano ostatnią dawkę. Zalecana jest przerwa rzędu 3 lub 4 dni między podaniem kolejnych dawek, o ile wystąpi taka potrzeba, w celu umożliwienia obserwacji opóźnionego zatrucia. Odstęp ten może zostać przedłużony np. w przypadku niejednoznacznej reakcji.

▼B

W przypadku stosowania górnej dawki granicznej na poziomie 5 000 mg/kg należy stosować procedurę przedstawioną w załączniku 3 (zob. także sekcja 1.6.2).

1.5.3.2. *Badanie graniczne*

Badanie graniczne jest stosowane w sytuacji gdy badający posiada informacje sugerujące, że badany materiał może być nietoksyczny np. posiada toksyczność na poziomie przekraczającym nieznacznie dawki graniczne określone przepisami wykonawczymi. Informacje na temat toksyczności można uzyskać na podstawie wiedzy na temat podobnych zbadanych związków lub podobnych badanych mieszanin lub produktów, z uwzględnieniem tożsamości i zawartości procentowej składników, o których wiadomo, że mają znaczenie z punktu widzenia toksyczności. W sytuacji niewystarczającej ilości lub braku informacji na temat toksyczności materiału badanego lub w przypadku gdy oczekuje się, że badany materiał może być toksyczny, należy przeprowadzić badanie zasadnicze.

W przypadku zastosowania normalnej procedury badanie graniczne dla potrzeb niniejszych wytycznych polega na podaniu dawki wyjściowej badania poglądowego, a następnie podaniu substancji czterem pozostałym zwierzętom.

1.6. OBSERWACJE

Zwierzęta są poddawane obserwacji osobniczej przynajmniej raz w ciągu pierwszych 30 minut po podaniu dawki, okresowo przez pierwsze 24 godziny, ze szczególnym uwzględnieniem pierwszych 4 godzin, a następnie codziennie, ogólnie przez 14 dni, z wyjątkiem sytuacji, w których muszą one zostać wyeliminowane z badań i uśmiercone w sposób humanitarny z uwagi na ich dobrostan, lub gdy padły. Jednakże czas trwania obserwacji nie powinien być ustalany według ścisłych reguł. Powinien zależeć od działania toksycznego, czasu wystąpienia skutków i długości okresu powrotu do stanu normalnego, i może skutkiem tego być wydłużony, w przypadku gdy zostanie to uznane za stosowne. Czas, w jakim pojawiają się i zanikają objawy zatrucia, jest istotny, szczególnie w przypadku występowania opóźnionych objawów zatrucia (11). Wszystkie spostrzeżenia są systematycznie zapisywane w ewidencji prowadzonej osobno dla każdego osobnika.

Dodatkowe obserwacje są wymagane, jeżeli zwierzęta wciąż wykazują objawy zatrucia. Obserwacje powinny dotyczyć zmian na skórze i futrze, oczach i błonach śluzowych, a także w układach oddechowym, krążenia, autonomicznym i centralnym układzie nerwowym oraz zmian w funkcjonowaniu somatomotorycznym i schematach zachowań. Szczególną uwagę należy poświęcić obserwacjom drżenia, konwulsji, ślinienia się, biegunki, letargu, snu i śpiączki. Należy przestrzegać zasad i kryteriów streszczonych w Wytycznych dotyczących humanitarnego punktu końcowego (8). Zwierzęta, u których stwierdzono stan agonalny, oraz zwierzęta wykazujące objawy silnego bólu, powinny zostać uśmiercone w sposób humanitarny. W przypadku uśmiercenia zwierząt z przyczyn humanitarnych lub ich zgonu, czas zgonu powinien zostać zapisany najdokładniej jak to możliwe.

1.6.1. **Masa ciała**

Masa każdego zwierzęcia powinna zostać określona na krótko przed podaniem substancji badanej i przynajmniej w odstępie tygodnia od jej podania. Zmiany masy powinny zostać obliczone i zapisane. Po zakończeniu badań zwierzęta, które przeżyły, są ważone i uśmiercane w sposób humanitarny.

▼B

1.6.2. **Patologia**

Wszystkie badane zwierzęta (włączając zwierzęta, które padły podczas badań lub zostały wyeliminowane z badań ze względu na ich dobrostan) powinny zostać poddane całkowitej sekcji zwłok. Wszystkie całkowite zmiany patologiczne powinny zostać zapisane oddzielnie dla każdego zwierzęcia. Badanie mikroskopowe organów wykazujących wyraźne zmiany patologiczne u zwierząt, które przeżyły 24 lub więcej godzin po podaniu pierwszej dawki, mogą również zostać rozważone, ponieważ mogą one dostarczyć użytecznych informacji.

2. **DANE**

Należy podać dane dla każdego zwierzęcia. Dodatkowo, wszystkie dane powinny zostać streszczone w tabeli, pokazującej dla każdej badanej grupy liczbę wykorzystanych sztuk, liczbę zwierząt wykazujących objawy zatrucia, liczbę zwierząt padłych w trakcie badań lub uśmierconych z przyczyn humanitarnych, czas zgonu poszczególnych zwierząt, opis oraz przebieg w czasie skutków zatrucia oraz powrotu do stanu normalnego, a także wyniki sekcji zwłok.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań musi zawierać następujące informacje, jeśli są one stosowne:

Substancja badana:

— charakter fizyczny, czystość, i jeśli to stosowne, właściwości fizyko-chemiczne (włączając rodzaj izomerii),

— identyfikację w tym numer CAS.

Nośnik (jeśli był użyty):

— uzasadnienie wyboru nośnika, jeśli jest inny niż woda.

Zwierzęta badane:

— użyty gatunek/szczep,

— stan mikrobiologiczny zwierzęcia, jeśli jest znany,

— liczbę, wiek i płeć zwierząt (włączając, o ile to stosowne, uzasadnienie wykorzystania samców zamiast samic),

— źródło, warunki środowiska, pożywienie itp.

Warunki badań:

— szczegóły dotyczące postaci substancji badanej, włączając stan skupienia podawanego środka,

— szczegóły dotyczące podawania substancji badanej, włączając objętość dawki oraz czas podawania dawki,

— szczegóły dotyczące jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety, źródło wody),

— uzasadnienie wyboru dawki wyjściowej.

▼B

Wyniki:

— tabelę przedstawiającą dane nt. reakcji oraz poziomów dawek dla każdego zwierzęcia (np. zwierząt wykazujących objawy zatrucia, włączając śmiertelność, a także charakter, intensywność oraz trwałość objawów),

— tabelę zawierającą informację na temat masy ciała oraz zmiany masy ciała,

— masę indywidualną zwierząt w dniu podania dawki, następnie w odstępach tygodniowych, a także w momencie śmierci lub uśmiercenia,

— data i czas śmierci, o ile nastąpiła przed przewidywanym uśmierceniem,

— przebieg w czasie objawów zatrucia i informacje, czy były one odwracalne w przypadku każdego zwierzęcia,

— wyniki sekcji zwłok oraz badań histopatologicznych dla każdego zwierzęcia, jeżeli są dostępne.

Omówienie i interpretacja wyników.

Wnioski.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparation on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 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 preparation for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 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, 469–482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem.Toxicol., 30, 313–324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl.Toxicol. 14, 315–323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed doseprocedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183–196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 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 N. 19.

▼B

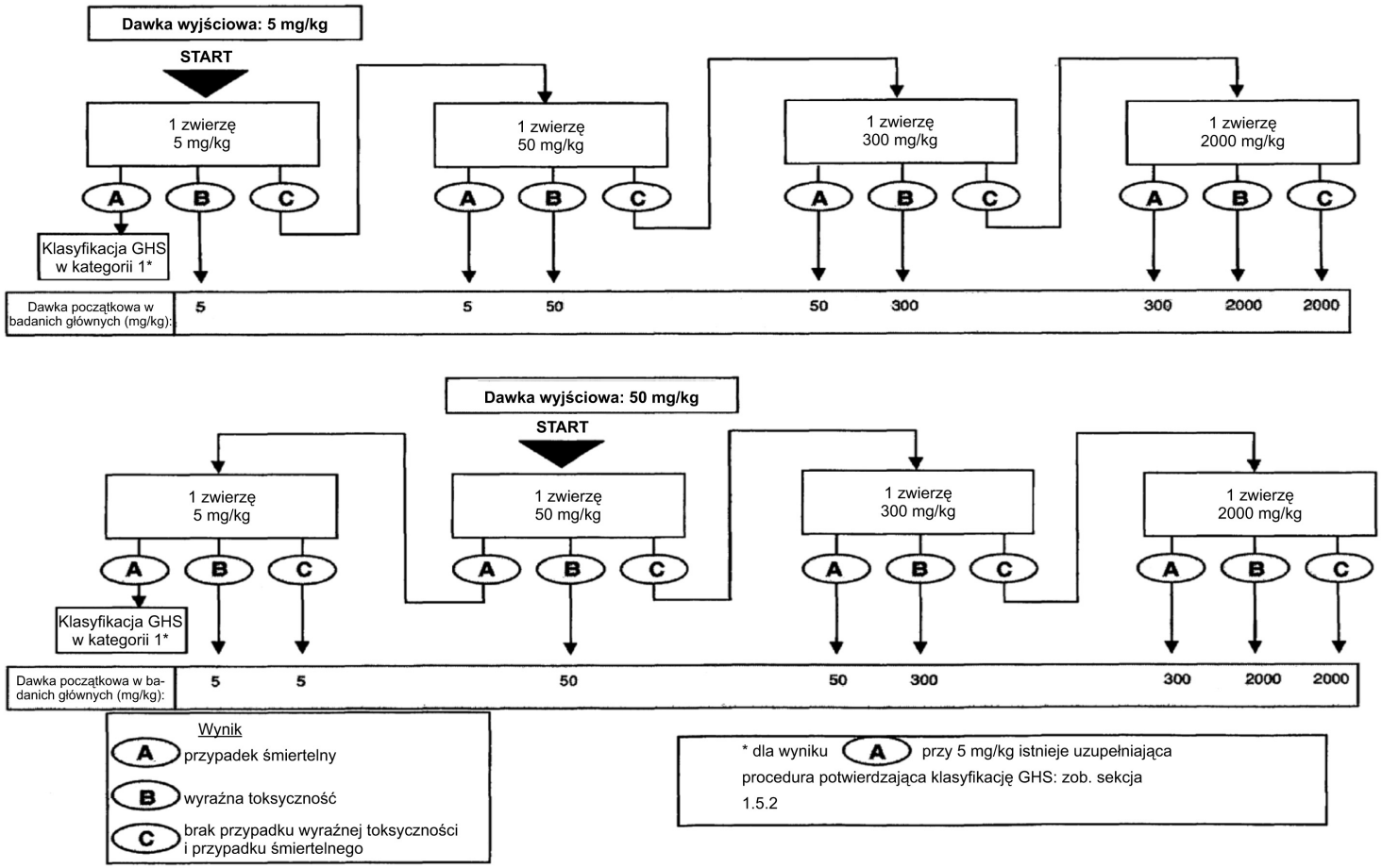
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

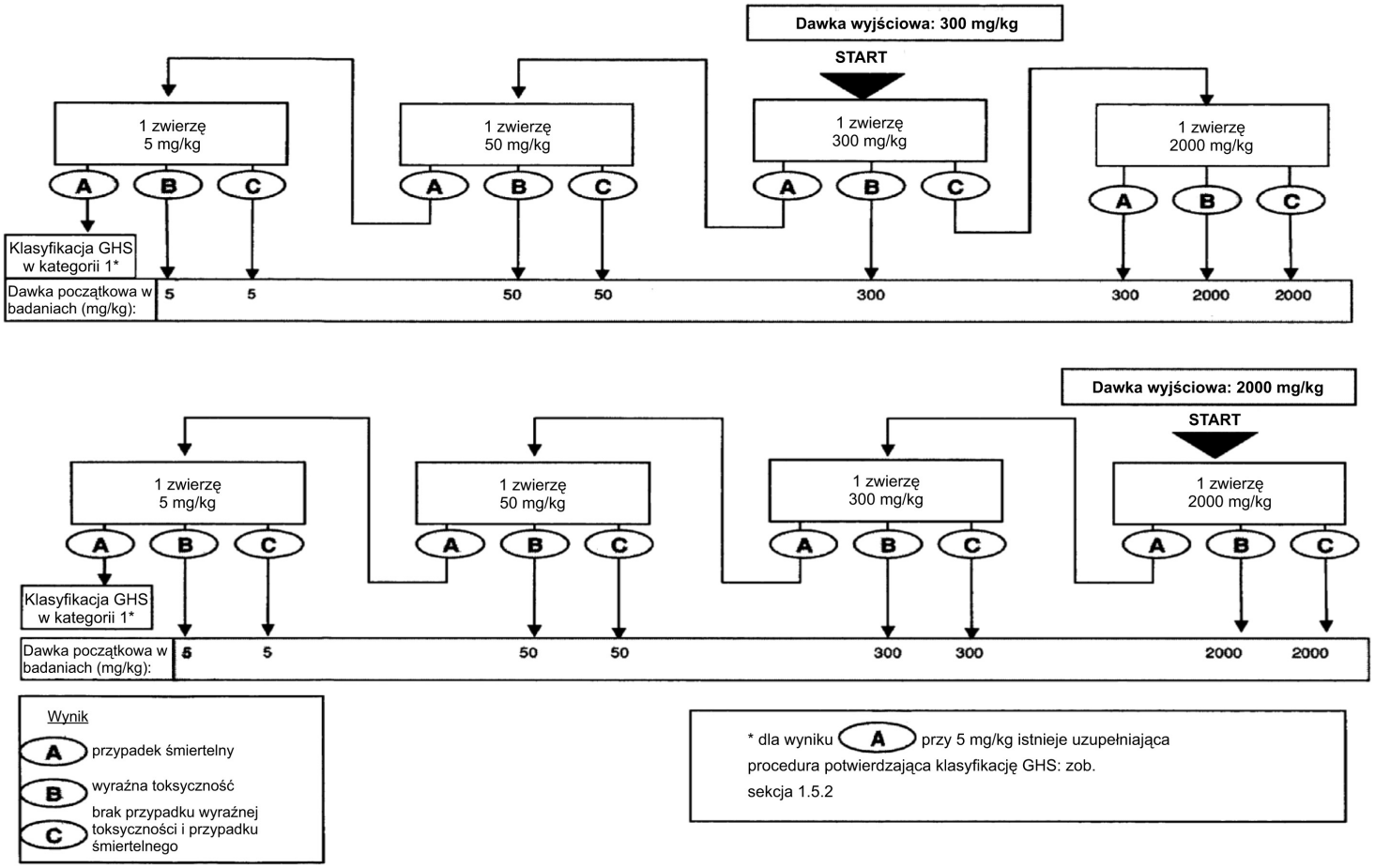
(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223–231.

(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3 rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

ZAŁĄCZNIK 1

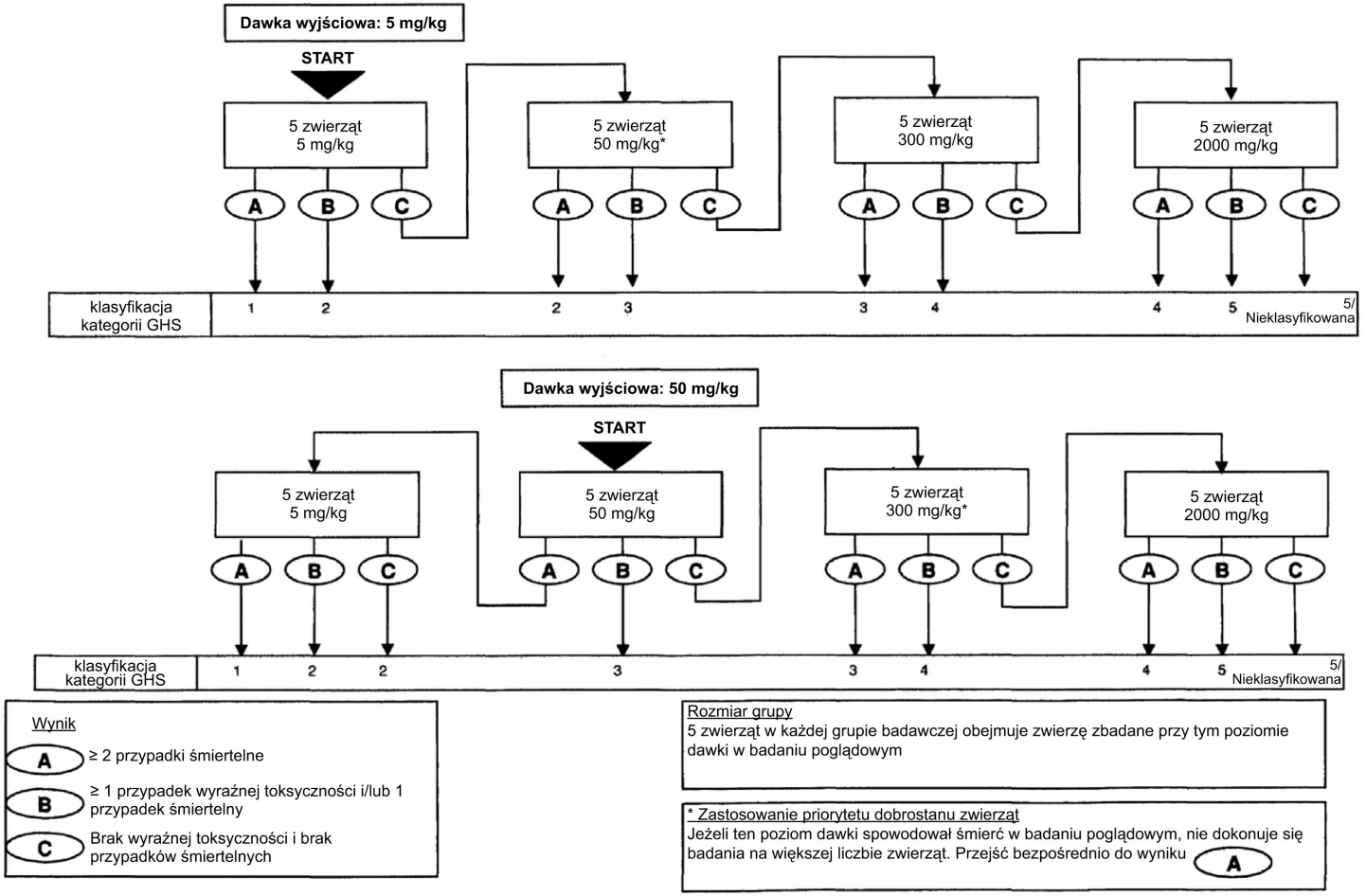
SCHEMAT DZIAŁAŃ DLA BADAŃ POGLĄDOWYCH

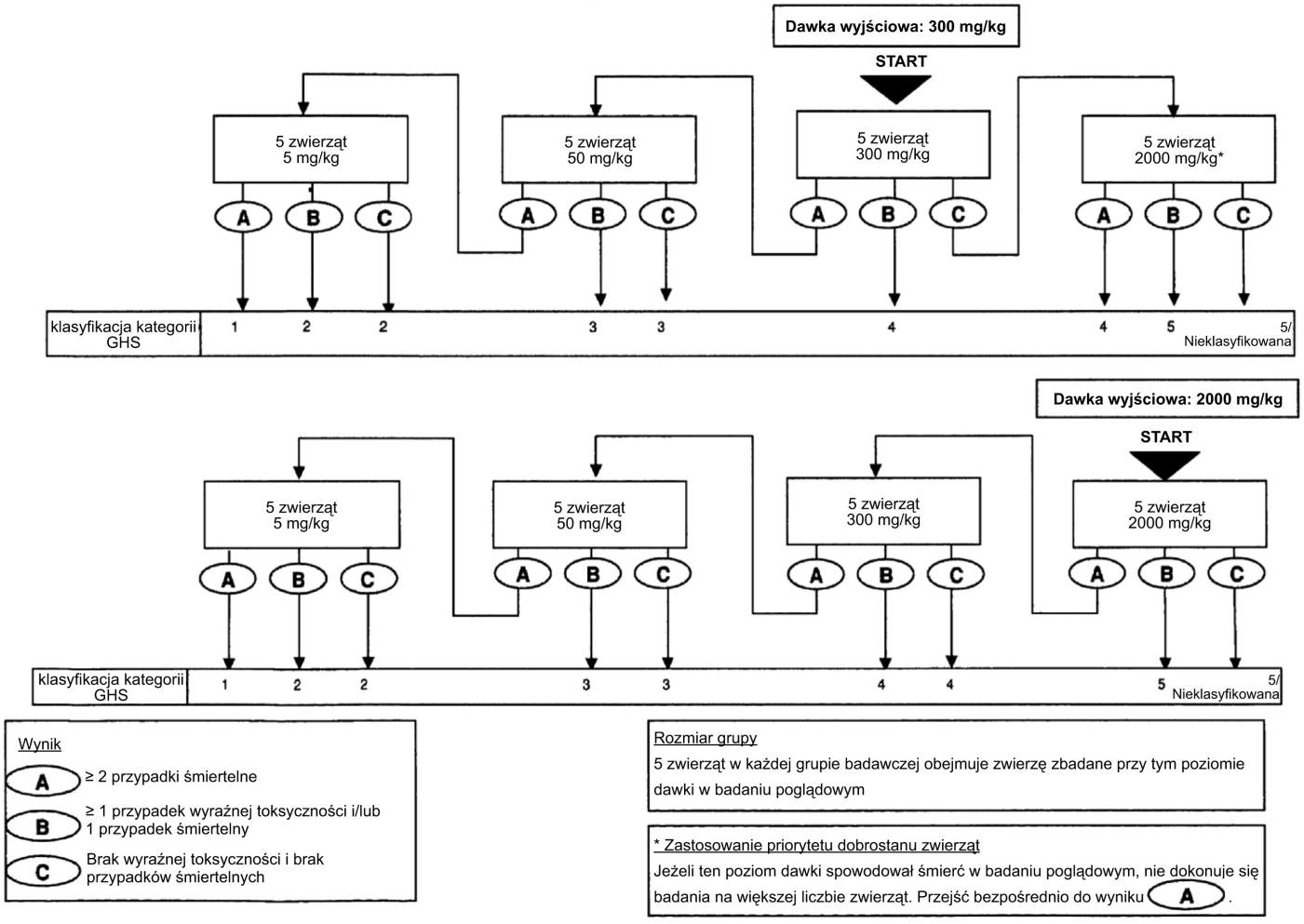



Dawka wyjściowa: 300 mg/kg
START
1 zwierzę 5 mg/kg
1 zwierzę 50 mg/kg
1 zwierzę 300 mg/kg
1 zwierzę 2000 mg/kg
A B C
Klasyfikacja GHS w kategorii 1*
Dawka początkowa w badaniach (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Dawka wyjściowa: 2000 mg/kg
START
1 zwierzę 5 mg/kg
1 zwierzę 50 mg/kg
1 zwierzę 300 mg/kg
1 zwierzę 2000 mg/kg
A B C
Klasyfikacja GHS w kategorii 1*
Dawka początkowa w badaniach (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Wynik
A przypadek śmiertelny
B wyraźna toksyczność
C brak przypadku wyraźnej toksyczności i przypadku śmiertelnego
* dla wyniku A przy 5 mg/kg istnieje uzupełniająca procedura potwierdzająca klasyfikację GHS: zob. sekcja 1.5.2

ZAŁĄCZNIK 2

SCHEMAT DZIAŁAŃ DLA BADAŃ ZASADNICZYCH




Dawka wyjściowa: 300 mg/kg
START
5 zwierząt 5 mg/kg
5 zwierząt 50 mg/kg
5 zwierząt 300 mg/kg
5 zwierząt 2000 mg/kg*
A B C
klasyfikacja kategorii GHS
1 2 2 3 3 4 4 5 5/ Nieklasyfikowana
Dawka wyjściowa: 2000 mg/kg
START
5 zwierząt 5 mg/kg
5 zwierząt 50 mg/kg
5 zwierząt 300 mg/kg
5 zwierząt 2000 mg/kg
A B C
klasyfikacja kategorii GHS
1 2 2 3 3 4 4 5 5/ Nieklasyfikowana
Wynik
A ≥ 2 przypadki śmiertelne
B ≥ 1 przypadek wyraźnej toksyczności i/lub 1 przypadek śmiertelny
C Brak wyraźnej toksyczności i brak przypadków śmiertelnych
Rozmiar grupy
5 zwierząt w każdej grupie badawczej obejmuje zwierzę zbadane przy tym poziomie dawki w badaniu poglądowym
* Zastosowanie priorytetu dobrostanu zwierząt
Jeżeli ten poziom dawki spowodował śmierć w badaniu poglądowym, nie dokonuje się badania na większej liczbie zwierząt. Przejść bezpośrednio do wyniku A.

▼B

ZAŁĄCZNIK 3

KRYTERIA KLASYFIKACJI SUBSTANCJI BADANYCH O OCZEKIWANYCH WARTOŚCIACH LD_{50} PRZEKRACZAJĄCYCH 2 000 MG/KG, Z POMINIĘCIEM BADAŃ

Kryteria kategorii niebezpieczeństwa 5 mają w zamierzeniu umożliwiać identyfikację substancji badanych, które charakteryzują się niskim niebezpieczeństwem ostrej toksyczności, lecz które w określonych okolicznościach mogą okazać się niebezpieczne dla populacji podatnych na zatrucie. Przewiduje się, że takie substancje charakteryzują się pokarmowym lub skórnym LD_{50} mieszczącym się w zakresie 2 000–5 000 mg/kg lub odpowiadają analogicznym dawkom w przypadku innych szlaków kontaktu z substancją. Substancja może zostać zaklasyfikowana do kategorii niebezpieczeństwa przy następujących cechach: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (kategoria 5 według GHS) w następujących przypadkach:

a) jeżeli została przypisana do tej kategorii w wyniku zastosowania jednego ze schematów przedstawionych w załączniku 2, w oparciu o poziom śmiertelności;

b) jeżeli dostępne są wiarygodne dowody wskazujące, że LD_{50} powinno znaleźć się w obrębie kategorii 5; bądź jeżeli inne badania na zwierzętach lub ostre skutki u ludzi sugerują niebezpieczeństwo dla zdrowia ludzkiego spowodowane ostrym działaniem;

c) jeżeli okazuje się, w wyniku przeprowadzenia ekstrapolacji, szacunków lub pomiaru danych, że przypisanie do wyższej klasy zagrożenia nie jest uzasadnione oraz:

   — dostępne są wiarygodne informacje wskazujące na silne skutki toksyczne u ludzi, lub

   — zaobserwowano przypadki zgonu w toku pomiarów do wartości kategorii 4 w przypadku podania substancji droga pokarmową, lub

   — jeżeli ocena eksperta potwierdzi wyraźne kliniczne objawy toksyczności, w trakcie pomiarów do wartości kategorii 4, z wyjątkiem przypadków biegunki, piloerekcji lub wyglądu odbiegającego w sposób negatywny od normy, lub

   — jeżeli ocena eksperta potwierdzi wiarygodność informacji wskazujących na potencjalne, znaczne, ostre działanie, uzyskanych w wyniku innych badań na zwierzętach.

BADANIA PRZY DAWKACH PRZEKRACZAJĄCYCH 2 000 MG/KG

W wyjątkowych okolicznościach i wyłącznie jeżeli wymagają tego określone potrzeby regulacyjne, można rozważyć podanie dawki dodatkowej stałej na górnym poziomie 5 000 mg/kg. Z uwagi na dobrostan zwierząt badania przy 5 000 mg/kg są odradzane i powinny być brane pod uwagę wyłącznie w przypadku znacznego prawdopodobieństwa, że wyniki takich badań przyniosą bezpośrednie korzyści dla ochrony zdrowia ludzkiego, zwierząt lub środowiska naturalnego (9).

Badanie poglądowe

Zakres przepisów niniejszej decyzji dotyczących procedury sekwencyjnej określonej w załączniku 1 zostaje rozszerzony o poziom dawki wynoszący 5 000 mg/kg. W związku z tym, jeżeli w przypadku zastosowania w badaniu poglądowym dawki początkowej wynoszącej 5 000 mg/kg wystąpi wynik A (zgon), należy zbadać następne zwierzę z wykorzystaniem dawki 2 000 mg/kg; pojawienie się wyników B i C (wyraźne zatrucie lub brak zatrucia) pozwoli na wybranie dawki 5 000 mg/kg jako dawki wyjściowej ma być: jako dawki wyjściowej badania głównego. Podobnie, jeżeli zostanie użyta inna dawka niż 5 000 mg/kg, badanie będzie zmierzało do zastosowania dawki 5 000 mg/kg w przypadku wystąpienia wyników B lub C przy 2 000 mg/kg; pojawienie się następnie wyniku A przy dawce 5 000 mg/kg wyznaczy dawkę wyjściową w badaniu zasadniczym przy 2 000 mg/kg, natomiast pojawienie się wyników B lub C wyznaczy dawkę wyjściową w badaniu głównym na 5 000 mg/kg.

▼B

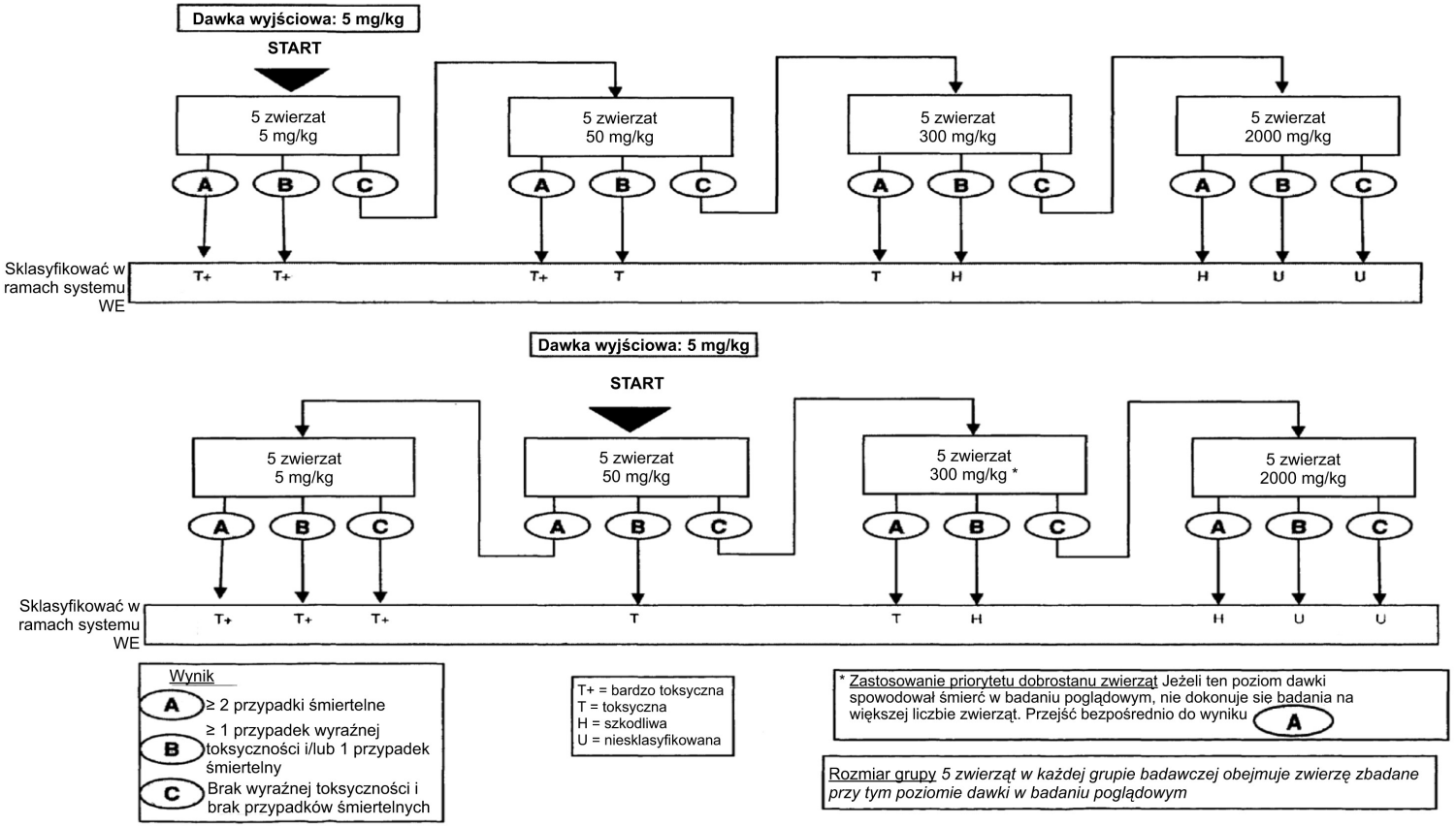
Badanie główne

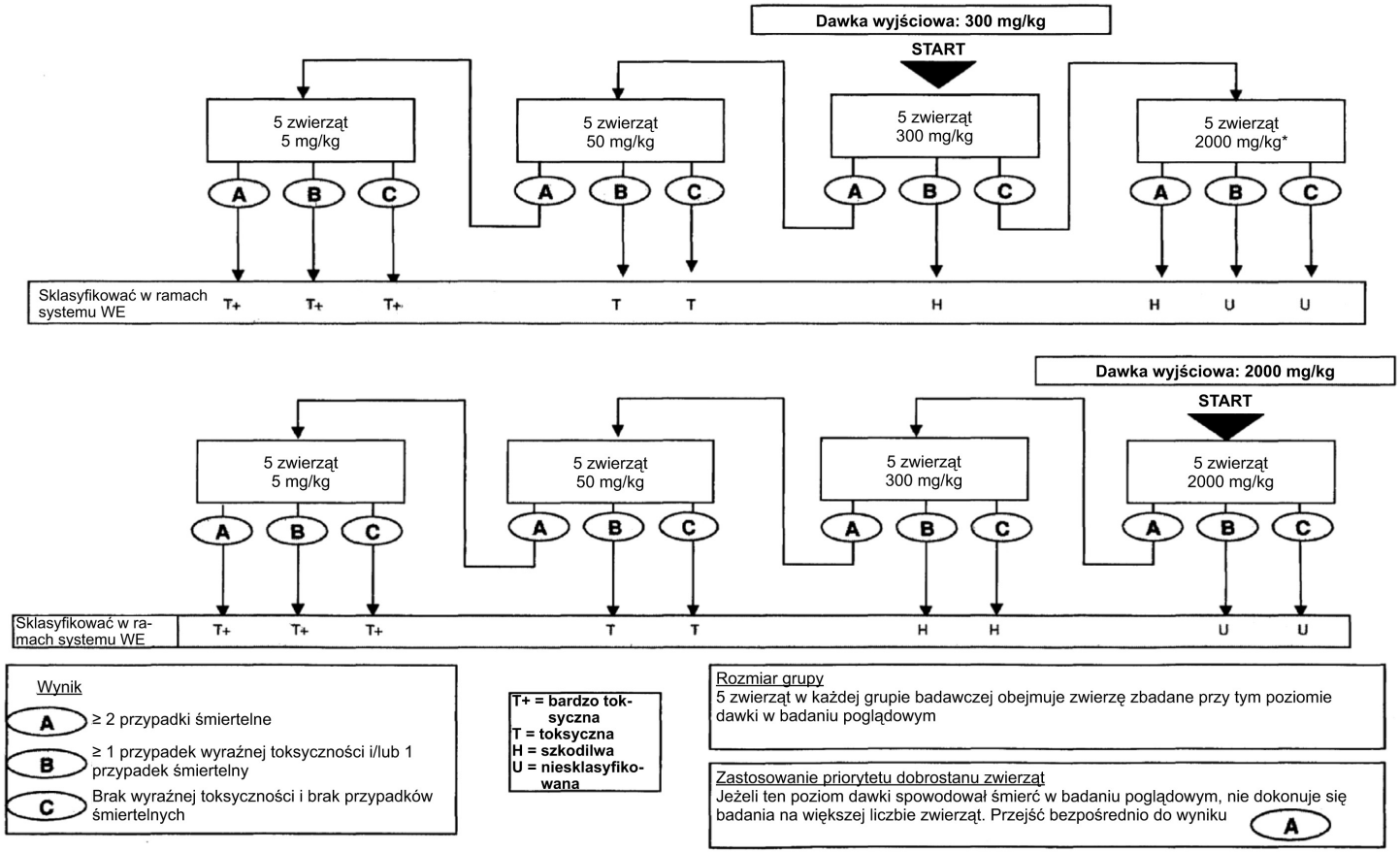
Zakres przepisów niniejszej decyzji dotyczących procedury sekwencyjnej określonej w załączniku 2 zostaje rozszerzony o poziom dawki wynoszący 5 000 mg/kg. W związku z tym, w przypadku gdy dawka wyjściowa badania zasadniczego wynosi 5 000 mg/kg, wynik A (≥ 2 przypadki śmiertelne) będzie wymagał zbadania drugiej grupy przy 2 000 mg/kg; wynik B (wyraźna toksyczność i/lub ≤ 1) lub wynik C (brak toksyczności) spowoduje niesklasyfikowanie substancji w ramach GHS. Podobnie, w przypadku zastosowania innej dawki początkowej niż 5 000 mg/kg, badanie będzie zmierzało do 5 000 mg/kg przy wyniku C przy 2 000 mg/kg; pojawienie się następnie wyniku A przy 5 000 mg/kg spowoduje przypisanie substancji do kategorii 5 GHS, natomiast pojawienie się wyników B lub C spowoduje niesklasyfikowanie substancji.

ZAŁĄCZNIK 4

METODA BADAWCZA B.1 bis

Wytyczne dotyczące klasyfikacji zgodnie z systemem WE obowiązującej w okresie przejściowym do momentu pełnego wdrożenia Globalnego Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji (GHS) (wytyczne pochodzą z pozycji bibliograficznej (8))




Dawka wyjściowa: 300 mg/kg
START
5 zwierząt 5 mg/kg
5 zwierząt 50 mg/kg
5 zwierząt 300 mg/kg
5 zwierząt 2000 mg/kg*
A B C
Sklasyfikować w ramach systemu WE
T+ T+ T+ T T H H U U
Dawka wyjściowa: 2000 mg/kg
START
5 zwierząt 5 mg/kg
5 zwierząt 50 mg/kg
5 zwierząt 300 mg/kg
5 zwierząt 2000 mg/kg
A B C
Sklasyfikować w ramach systemu WE
T+ T+ T+ T T H H U U
Wynik
A ≥ 2 przypadki śmiertelne
B ≥ 1 przypadek wyraźnej toksyczności i/lub 1 przypadek śmiertelny
C Brak wyraźnej toksyczności i brak przypadków śmiertelnych
T+ = bardzo toksyczna
T = toksyczna
H = szkodliwa
U = niesklasyfikowana
Rozmiar grupy
5 zwierząt w każdej grupie badawczej obejmuje zwierzę zbadane przy tym poziomie dawki w badaniu poglądowym
Zastosowanie priorytetu dobrostanu zwierząt
Jeżeli ten poziom dawki spowodował śmierć w badaniu poglądowym, nie dokonuje się badania na większej liczbie zwierząt. Przejść bezpośrednio do wyniku A

▼B

B.1 ter. **TOKSYCZNOŚĆ OSTRA POKARMOWA – METODA KLAS OSTREJ TOKSYCZNOŚCI**

1. **METODA**

Niniejsza metoda badawcza jest kopią OECD TG 423 (2001).

1.1. WPROWADZENIE

Metoda klas ostrej toksyczności (1) przyjęta w tym badaniu jest procedurą stopniową, w której dla każdego stopnia wykorzystywane są trzy osobniki zwierząt jednej płci. Zależnie od śmiertelności oraz/lub stanu agonalnego zwierząt do stwierdzenia ostrej toksyczności badanej substancji konieczne mogą być średnio 2–4 etapy. Niniejsza procedura jest powtarzalna, w jej toku wykorzystuje się niewiele zwierząt i daje ona możliwość klasyfikacji substancji w sposób podobny do innych metod badania ostrej toksyczności. Metoda klas ostrej toksyczności opiera się na ocenach biometrycznych (2)(3)(4)(5) przeprowadzonych z wykorzystaniem stałych dawek, oddzielonych w odpowiedni sposób umożliwiający ocenę substancji dla celów klasyfikacji i oceny niebezpieczeństwa. Metoda ta została przyjęta w 1996 r. i była poddawana intensywnej weryfikacji *in vivo* w oparciu o dane o LD_{50} uzyskane z literatury, zarówno na szczeblu narodowym (6), jak i międzynarodowym (7).

Wytyczne dotyczące wyboru najbardziej odpowiedniej metody badawczej dla danego przypadku zostały zamieszczone w Wytycznych dotyczących badania toksyczności ostrej pokarmowej (8). Wytyczne te zawierają ponadto dodatkowe informacje na temat przeprowadzania i interpretacji Metody badawczej B.1ter.

Nie jest również konieczne podawanie dawek mogących powodować silny ból lub strach wynikający z działania żrącego lub podrażniającego. Zwierzęta w stanie agonalnym lub w oczywisty sposób cierpiące albo chore i doświadczające strachu powinny zostać uśmiercone w humanitarny sposób i uwzględniane w interpretacji wyników badań jako zwierzęta padłe w trakcie badania. Kryteria podejmowania decyzji co do uśmiercenia zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących ból oraz wytyczne dotyczące rozpoznawania przewidywalnego lub zbliżającego się zgonu, są zawarte w oddzielnych Wytycznych (9).

Metoda opiera się na wcześniej określonych dawkach, a wyniki uzyskane w wyniku jej zastosowania pozwalają na ocenę i klasyfikację zgodną z Globalnym Zharmonizowanym Systemem klasyfikacji związków chemicznych pod względem ich ostrej toksyczności (10).

W zasadzie niniejsza metoda nie pozwala na dokładne obliczenie LD_{50}, lecz pozwala na określenie zakresu ekspozycji, tam gdzie oczekiwana jest śmiertelność, ponieważ śmierć określonego odsetka zwierząt nadal stanowi jeden z głównych punktów końcowych badania. Metoda umożliwia określenie wartości LD_{50} wyłącznie w przypadku, gdy przynajmniej dwie dawki spowodowały śmiertelność wyższą niż 0 %, lecz mniejszą niż 100 %. Wykorzystanie selekcji wcześniej określonych dawek, niezależnie od substancji badanej, której klasyfikacja jest wyraźnie powiązana z liczbą zwierząt obserwowanych na poszczególnych etapach, poprawia możliwości laboratoriom w zakresie konsekwencji i powtarzalności sprawozdań laboratoryjnych.

▼B

Laboratorium badawcze powinno uwzględniać wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji przed rozpoczęciem badań. Informacje te powinny obejmować tożsamość i budowę chemiczną substancji; właściwości fizyko-chemiczne; wyniki innych badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo* substancji; dane dotyczące toksyczności substancji pokrewnych pod względem budowy; przewidywane zastosowanie (zastosowania) tej substancji. Informacje te są niezbędne celem spełnienia wszelkich wymogów dotyczących ochrony zdrowia ludzkiego i umożliwienia wyboru najbardziej odpowiedniej dawki wyjściowej.

1.2. DEFINICJE

Toksyczność ostra pokarmowa: oznacza niepożądane skutki pojawiające się w następstwie podania doustnego pojedynczej dawki substancji lub wielu dawek w okresie 24 godzin.

Opóźniona śmierć: oznacza, że zwierzę nie umiera, ani nie wydaje się być w agonii przez 48 godzin, lecz pada później w 14-dniowym okresie obserwacyjnym.

Dawka: oznacza ilość podanej substancji badanej. Dawka jest wyrażana w wadze próbki na jednostkę masy zwierzęcia (np. mg/kg).

GHS: Globalny Zharmonizowany System Klasyfikacji Substancji i Mieszanin Chemicznych. Połączone działania OECD (w dziedzinie zdrowia ludzkiego i ochrony środowiska), Komitetu Ekspertów ONZ w sprawie transportu towarów niebezpiecznych (w zakresie właściwości fizyko-chemicznych) i Międzynarodowej Organizacji Pracy (ILO) (w zakresie wymiany informacji na temat niebezpieczeństw), koordynowane w ramach Międzyorganizacyjnego programu na rzecz właściwego zarządzania związkami chemicznymi (IOMC).

Zagrażająca śmierć: występuje w przypadku, gdy przewiduje się wystąpienie stanu agonalnego lub śmierć przed następnym zaplanowanym punktem czasowym obserwacji. Objawy wskazujące na ten stan mogą obejmować u gryzonia konwulsje, ułożenie na boku, pozycję leżącą oraz drgawki (zob. Wytyczne dotyczące humanitarnego punktu końcowego (9) celem uzyskania szczegółowych informacji).

LD_{50} (średnia dawka śmiertelna): jest statystycznie wyprowadzoną pojedynczą dawką substancji, która powoduje zgon 50 procent zwierząt, przy podaniu drogą pokarmową. Wartość LD_{50} jest wyrażona w wadze substancji badanej na jednostkę masy badanego zwierzęcia (mg/kg).

Dawka graniczna: oznacza górną dawkę graniczną w badaniach (2 000 lub 5 000 mg/kg).

Stan agonalny: stan śmierci lub niezdolności do przeżycia nawet w przypadku zastosowania leczenia (zob. Wytyczne metodyczne dotyczące humanitarnego punktu końcowego ([9]) w celu uzyskania danych szczegółowych).

Przewidywana śmierć: obecność objawów klinicznych wskazujących na nadchodzący zgon w przewidzianym czasie w przyszłości przed planowanym zakończeniem eksperymentu, na przykład: niezdolność do dotarcia do wody lub pożywienia (zob. Wytyczne metodyczne dotyczące humanitarnego punktu końcowego (9) w celu uzyskania danych szczegółowych).

▼B

1.3. ZASADA METODY BADANIA

Zasadą badania jest to, że w oparciu o procedurę etapową z użyciem minimalnej liczby zwierząt na każdym etapie uzyskiwane są wystarczające informacje na temat ostrej toksyczności substancji badanej w celu jej zaklasyfikowania. Substancja jest podawana doustnie grupie zwierząt laboratoryjnych w jednej z określonych dawek. Substancja jest badana przy użyciu procedury etapowej, na każdym etapie wykorzystywane są trzy zwierzęta jednej płci (na ogół samice). Brak lub obecność śmiertelności związanej z podaniem odczynnika zwierzętom determinuje następny etap, tj.:

— dalsze badania są zbyteczne,

— dawka zostaje podana trzem następnym zwierzętom,

— dawka na następnym niższym bądź wyższym poziomie zostaje podana trzem następnym zwierzętom.

Szczegóły procedury są opisane w załączniku 1. Metoda pozwala na ocenę w odniesieniu do przypisania substancji badanej do jednej z szeregu klas toksyczności określonych poprzez ustalone wartości odcinania D_{50}.

1.4. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.4.1. **Wybór gatunków zwierząt**

Preferowanym gatunkiem gryzonia jest szczur, choć dopuszcza się wykorzystywanie innych gatunków gryzoni. Na ogół w doświadczeniach wykorzystuję się samice (9). Wynika to z faktu, znajdującego swoje potwierdzenie w literaturze na temat konwencjonalnych badań LD_{50}, że różnice między płciami są znikome, lecz tam gdzie występują, samice są z reguły nieznacznie bardziej wrażliwe (11). Jednakże jeżeli wiedza na temat właściwości toksykologicznych i toksokinetycznych związków o podobnej budowie wskazuje na to, że samce mogą być bardziej wrażliwe, w takim przypadku należy wybrać do badania tę płeć. Jeżeli badanie jest przeprowadzane na samcach, należy podać uzasadnienie.

Zaleca się wykorzystanie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt pochodzących ze szczepów na ogół wykorzystywanych w laboratorium. Samice powinny być bezdzietne i niecięŻarne. Każde zwierzę na początku cyklu laboratoryjnego powinno być w wieku między 8 a 12 tygodniem, a jego masa nie powinna przekraczać lub być mniejsza o ± 20 % średniej masy wszystkich wykorzystywanych uprzednio zwierząt.

1.4.2. **Warunki przebywania i warunki żywieniowe**

Temperatura w badawczych pomieszczeniach hodowlanych powinna wynosić 20 °C (± 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin jasno, 12 godzin ciemno. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Zwierzęta mogą być grupowane w klatkach w sposób nieograniczający łatwej obserwacji pojedynczych sztuk.

▼B

1.4.3. **Przygotowanie zwierząt**

Zwierzęta są wybierane losowo, oznaczane w sposób umożliwiający identyfikację pojedynczych osobników i przetrzymywane w swoich klatkach przynajmniej przez 5 dni przed podaniem pierwszej dawki, co umożliwia aklimatyzację do warunków laboratoryjnych.

1.4.4. **Przygotowanie dawek**

Na ogół badana substancja powinna być podawana w dawkach o stałej objętości przy zmianie stężenia dawkowanego preparatu. Jednakże w przypadku badania końcowego produktu będącego cieczą lub mieszaniną dla celów oceny ryzyka tej substancji bardziej stosowne może okazać się wykorzystanie w badaniach substancji nierozcieńczonej. tj. substancji o stałym stężeniu. Wymóg ten może być ponadto określony w niektórych przepisach wykonawczych. W żadnym razie niedopuszczalne jest przekroczenie maksymalnej objętości przewidzianej do podania. Maksymalna objętość cieczy podanej jednorazowo zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Dla gryzoni objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100g masy ciała: jednakże w przypadku roztworów wodnych dopuszczalne jest przyjęcie dawki 2 ml/100 g masy ciała. Jeżeli chodzi o przygotowywanie dozowanego preparatu należy użyć, o ile to możliwe, roztworów/zawiesin/emulsji wodnych, następnie rozważyć przygotowanie roztworów/zawiesin/emulsji w oleju (np. oleju kukurydzianym), a dopiero w następnej kolejności roztworów innych nośników. W przypadkach stosowania nośnika różnego od wody muszą być znane jego właściwości toksykologiczne. Dawki muszą być przygotowywane na krótko przed podaniem, chyba że stabilność przygotowanego preparatu w okresie w jakim ma on być stosowany jest znana i możliwa do przyjęcia.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Podawanie dawki**

Substancja badana jest podawana w formie pojedynczej dawki przez zgłębnik przy użyciu sondy przełykowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. W nietypowych przypadkach, gdy niemożliwe jest podanie pojedynczej dawki, jednorazowa dawka może zostać rozbita na mniejsze porcje i podawana w odstępach czasowych w okresie nieprzekraczającym 24 godzin.

Zwierzęta powinny być wyposzczone przed podaniem dawki (np. szczurom należy wstrzymać podawanie jedzenia przez noc, lecz nie wstrzymywać podawania wody, myszom należy wstrzymać podawanie jedzenia przez 3–4 godziny, lecz nie wstrzymywać wody). Następnie, po wyposzczeniu, zwierzęta należy zważyć oraz podać im substancję badaną. W przypadku szczurów, po podaniu substancji badanej można wstrzymać podawanie jedzenia przez 3–4 godziny, a w przypadku myszy przez 1–2 godziny. Jeżeli dawka jest podawana porcjami przez określony czas, może być konieczne podanie pokarmu i wody w zależności od długości okresu podawania dawki.

1.5.2. **Liczba zwierząt i poziomy dawki**

Na każdym etapie wykorzystywane są trzy zwierzęta. Poziom dawki, która ma być wykorzystana jako dawka wyjściowa, jest wybierana z jednego z czterech stałych poziomów 5, 50, 300 i 2 000 mg/kg masy ciała. Poziom wyjściowy dawki powinien być taki, żeby powodował śmiertelność u niektórych zwierząt, którym ją zaaplikowano. Schemat postępowania zamieszczony w załączniku 1 opisuje procedurę, którą należy podjąć dla każdej dawki wyjściowej. Dodatkowo, do momentu przyjęcia nowego GHS, obowiązujące są wytyczne zawarte w załączniku 4, dotyczące klasyfikacji substancji w ramach systemu WE.

▼B

Jeżeli dostępne informacje sugerują brak prawdopodobieństwa śmiertelności przy najwyższym poziomie dawki (2 000 mg/kg masy ciała), powinno zostać przeprowadzone badanie graniczne. W przypadku braku informacji na temat danej substancji, która ma być badana, z uwagi na dobrostan zwierząt zalecane jest zastosowanie dawki wyjściowej 300 mg/kg masy ciała.

Odstępy między podawaniem dawek na każdym poziomie określa się na podstawie czasu wystąpienia, długości trwania i dokuczliwości objawów zatrucia. Podanie zwierzęciu następnej dawki powinno zostać opóźnione do momentu uzyskania pewności co do możliwości przeżycia zwierząt, którym podano ostatnią dawkę.

W wyjątkowych okolicznościach i wyłącznie jeżeli wymagają tego określone potrzeby regulacyjne, można rozważyć podanie dawki dodatkowej ustalonej na górnym poziomie 5 000 mg/kg (zob. załącznik 3). Z uwagi na dobrostan zwierząt badania na zwierzętach w zakresie kategorii 5 GSH (2 000 i 5 000 mg/kg) są odradzane i powinny być rozważane wyłącznie w przypadku znacznego prawdopodobieństwa, że wyniki takich badań przyniosą bezpośrednie korzyści dla ochrony zdrowia ludzkiego, zwierząt lub środowiska naturalnego.

1.5.3. **Badanie graniczne**

Badanie graniczne jest stosowane w sytuacji gdy badający posiada informacje sugerujące, że badany materiał może być nietoksyczny np. posiada toksyczność na poziomie przekraczającym nieznacznie dawki graniczne określone przepisami wykonawczymi. Informacje na temat toksyczności mogą zostać uzyskane na podstawie wiedzy na temat podobnych zbadanych związków lub podobnych zbadanych mieszanin lub produktów, z uwzględnieniem tożsamości i zawartości procentowej składników, o których wiadomo, że mają znaczenia z punktu widzenia toksyczności. W sytuacji niewystarczającej ilości lub braku informacji na temat toksyczności materiału testowego lub w przypadku gdy, zgodnie z oczekiwaniami, badany materiał może być toksyczny, należy przeprowadzić badanie zasadnicze.

Badanie graniczne dla jednej dawki na poziomie 2 000 mg/kg masy ciała może zostać przeprowadzone na sześciu zwierzętach (trzy na każdym etapie). W wyjątkowych okolicznościach dopuszczalne jest przeprowadzenie badania granicznego przy jednej dawce na poziomie 5 000 mg/kg na trzech zwierzętach (zob. załącznik 2). W przypadku wystąpienia śmiertelności związanej z substancją badaną konieczne może okazać się przeprowadzenie badania na następnym niższym poziomie.

1.6. OBSERWACJE

Zwierzęta są poddawane obserwacji osobniczej przynajmniej raz w ciągu pierwszych 30 min. po podaniu dawki, okresowo przez pierwsze 24 godziny, ze szczególnym uwzględnieniem pierwszych 4 godzin, a następnie codziennie ogólnie przez 14 dni, z wyjątkiem sytuacji w których muszą one zostać wyeliminowane z badań i humanitarnie zabite ze względu na ich dobro, lub zostały znalezione martwe. Jednakże czas trwania obserwacji nie powinien być ustalany według ścisłych reguł. Powinien on być zależny od działania toksycznego, czasu wystąpienia skutków i długości okresu powrotu do stanu normalnego, i może skutkiem tego być przedłużany, w przypadku gdy zostanie to uznane za stosowne. Czas w jakim pojawiają się i zanikają objawy zatrucia jest istotny, szczególnie w przypadku występowania opóźnionych objawów zatrucia (11). Wszystkie obserwacje są systematycznie zapisywane w ewidencji prowadzonej osobno dla każdego zwierzęcia.

▼B

Dodatkowe obserwacje będą wymagane, jeżeli zwierzęta wciąż wykazują objawy zatrucia. Obserwacje powinny dotyczyć zmian na skórze i futrze, oczach i śluzówce a także w układach oddechowym, krążenia, autonomicznym i centralnym układzie nerwowym oraz zmian w funkcjonowaniu somatomotorycznym i schematach zachowania. Szczególną uwagę należy poświęcić obserwacjom drżenia, drgawek, ślinienia się, biegunki, letargu, snu i śpiączki. Należy przestrzegać zasad i kryteriów streszczonych w Wytycznych dotyczących humanitarnego punktu końcowego. Zwierzęta u których stwierdzono stan agonalny oraz zwierzęta wykazujące objawy silnego bólu powinny zostać uśmiercone w sposób humanitarny. W przypadku uśmiercenia zwierząt z przyczyn humanitarnych lub stwierdzenia u nich zgonu, czas zgonu powinien zostać zapisany najdokładniej, jak to jest możliwe.

1.6.1. **Masa ciała**

Masa każdego zwierzęcia powinna zostać określona na krótko przed podaniem substancji badanej i przynajmniej w odstępie tygodnia od jej podania. Zmiany masy powinny zostać obliczone i zapisane. Po zakończeniu badań zwierzęta, które przeżyły, są ważone i humanitarnie uśmiercane.

1.6.2. **Patologia**

Wszystkie badane zwierzęta (włączając zwierzęta, które padły podczas badań lub zostały wyeliminowane z badań ze względu na ich dobro) powinny zostać poddane całkowitej sekcji zwłok. Wszystkie całkowite zmiany patologiczne powinny zostać zapisane oddzielnie dla każdego zwierzęcia. Badanie mikroskopowe organów wykazujących ewidentne zmiany patologiczne u zwierząt, które przeżyły 24 lub więcej godzin po podaniu pierwszej dawki, mogą również zostać wzięte pod uwagę, ponieważ mogą one dostarczyć użytecznych informacji.

2. **DANE**

Należy podać dane dla każdego zwierzęcia. Dodatkowo, wszystkie dane powinny zostać streszczone w tabeli pokazującej dla każdej badanej grupy liczbę wykorzystanych sztuk, liczbę zwierząt wykazujących objawy zatrucia, liczbę zwierząt, u których stwierdzono zgon w trakcie badań lub uśmierconych z przyczyn humanitarnych, czas zgonu poszczególnych zwierząt, opis oraz przebieg w czasie objawów zatrucia oraz powrotu do stanu normalnego, a także wyniki sekcji.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań musi zawierać następujące informacje, o ile są one stosowne:

Substancja badana:

— charakter fizyczny, czystość, i jeśli to stosowne, właściwości fizyko-chemiczne (włączając rodzaj izomerii),

— identyfikacja, w tym numer CAS.

Nośnik (jeśli był użyty):

— uzasadnienie wyboru nośnika, jeśli jest inny niż woda.

Zwierzęta badane:

— użyty gatunek/szczep,

▼B

— stan mikrobiologiczny zwierzęcia, jeśli jest znany,

— liczbę, wiek i płeć zwierząt (włączając, o ile to stosowne, uzasadnienie wykorzystania samców zamiast samic),

— źródło, warunki środowiska, pożywienie itp.

Warunki badań:

— szczegóły dotyczące postaci substancji badanej, włączając stan skupienia podawanego środka,

— szczegóły dotyczące podawania substancji badanej, włączając objętość dawki oraz czas podawania dawki,

— szczegóły dotyczące jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety, źródło wody),

— uzasadnienie wyboru dawki wyjściowej.

Wyniki:

— tabelę przedstawiającą dane nt. reakcji oraz poziomów dawek dla każdego zwierzęcia (np. zwierząt wykazujących objawy zatrucia, włączając śmiertelność, charakter, intensywność oraz trwałość objawów),

— tabelę zawierającą informacje na temat masy ciała oraz zmian masy ciała,

— masę indywidualną zwierząt w dniu podania dawki, następnie w tygodniowych odstępach, a także w momencie śmierci lub uśmiercenia,

— data i czas śmierci, o ile nastąpiła przed przewidywanym uśmierceniem,

— przebieg w czasie objawów zatrucia i czy były one odwracalne w przypadku każdego zwierzęcia,

— wyniki sekcji oraz badań histopatologicznych w odniesieniu do każdego zwierzęcia, jeżeli są dostępne.

Omówienie i interpretacja wyników.

Wnioski.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336–341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute- Toxic-Class Metoda (Oral). Arch. Toxicol. 68, 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, 729–734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Metodas: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX16, 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, 659–670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Grade N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Grade 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 N 19.

(10) 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 in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/stronas/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, 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

ZAŁĄCZNIK 1

PROCEDURA REALIZOWANA W PRZYPADKU DAWEK WYJŚCIOWYCH

UWAGI OGÓLNE

Dla każdej dawki wyjściowej, odpowiednie schematy badań zawarte w niniejszym załączniku przedstawiają procedurę, jaką należy zastosować.

— ZAŁĄCZNIK 1a: Dawka początkowa wynosi 5 mg/kg.

— ZAŁĄCZNIK 1b: Dawka początkowa wynosi 50 mg/kg.

— ZAŁĄCZNIK 1c: Dawka początkowa wynosi 300 mg/kg.

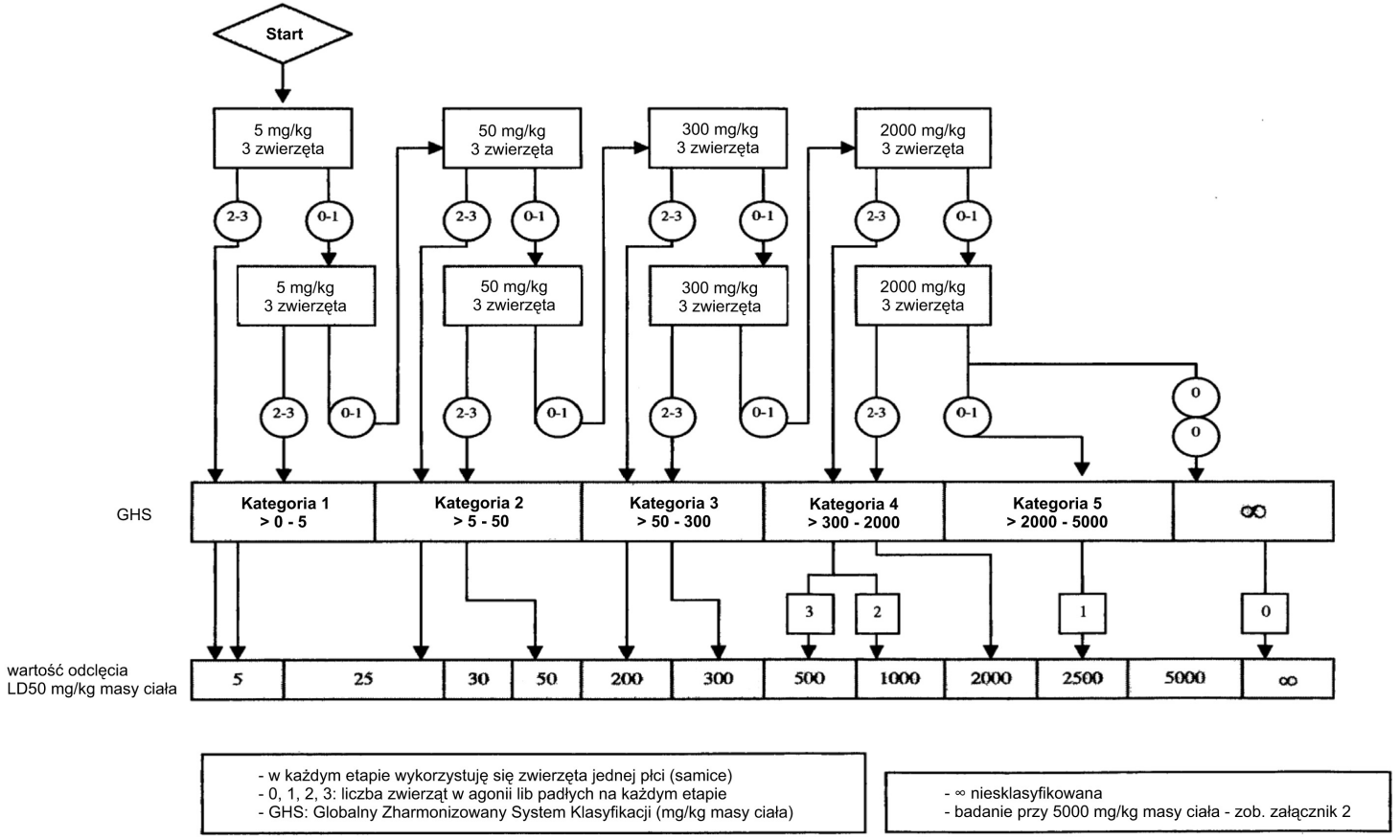
— ZAŁĄCZNIK 1d: Dawka początkowa wynosi 2 000 mg/kg.

W zależności od liczby zwierząt uśmierconych w sposób humanitarny lub martwych zwierząt procedura badań przebiega zgodnie z kierunkiem wyznaczanym przez strzałki.

▼B

ZAŁĄCZNIK 1A

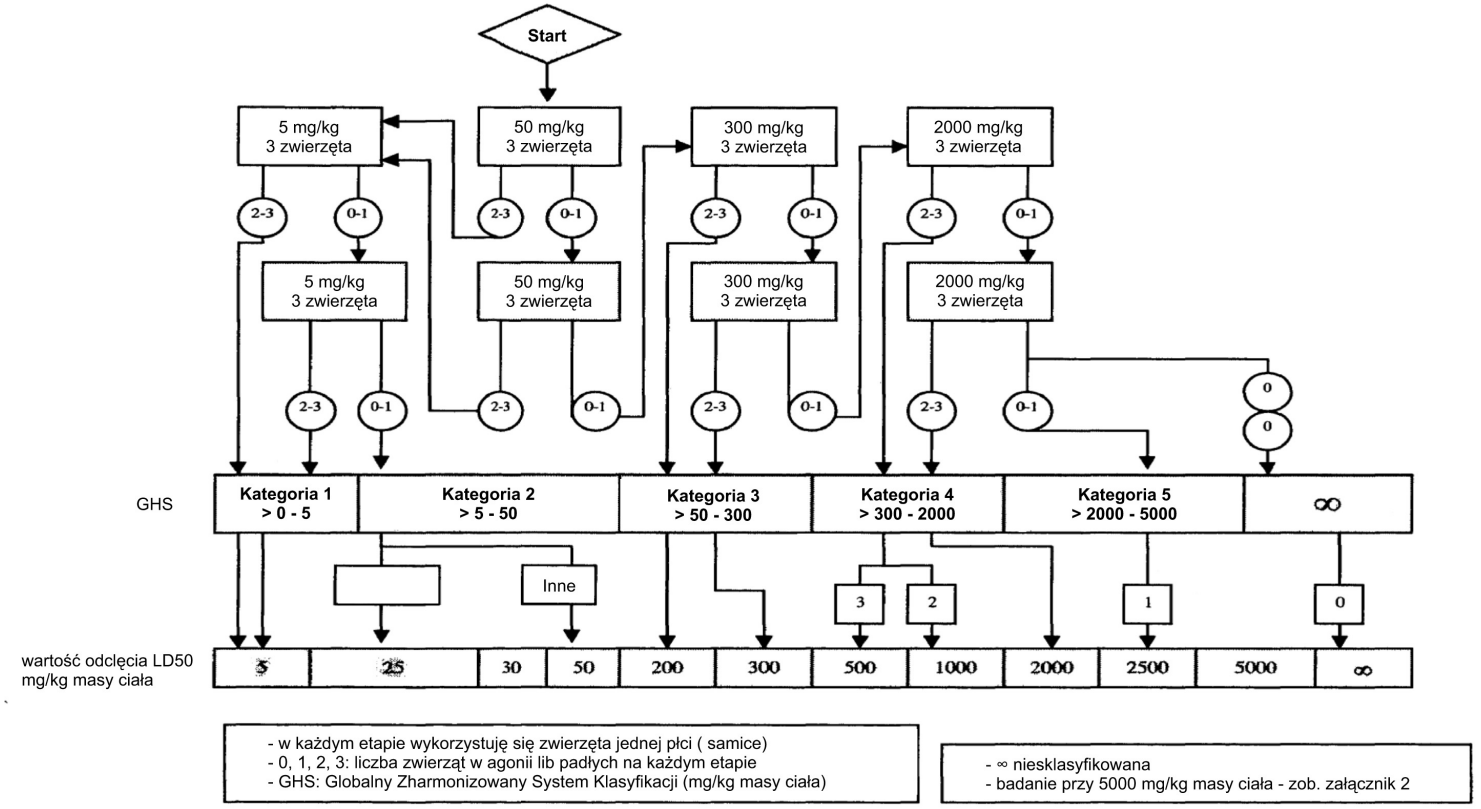
PROCEDURA BADANIA PRZY DAWCE WYJŚCIOWEJ 5 MG/KG MASY CIAŁA



▼B

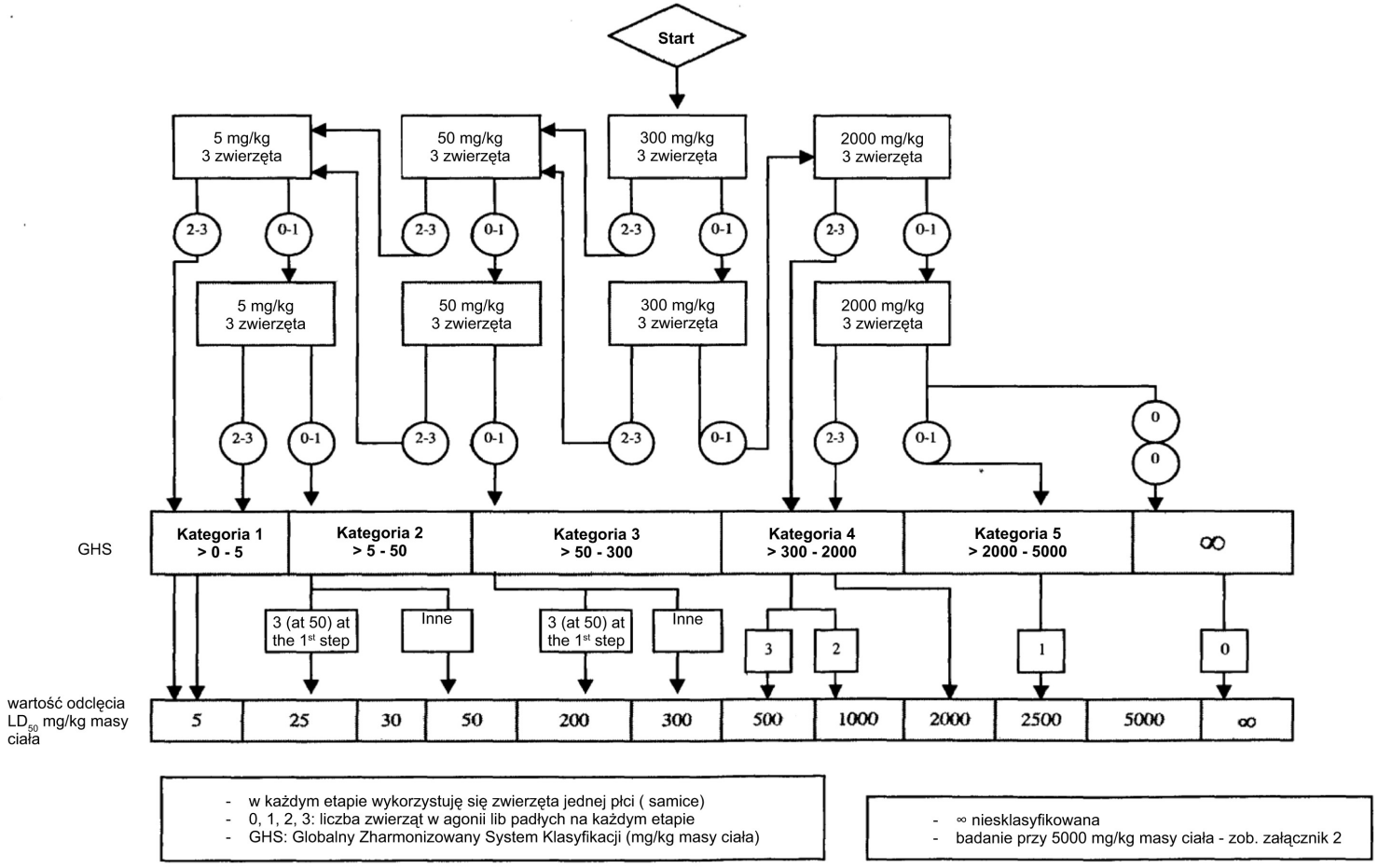
ZAŁĄCZNIK 1B

PROCEDURA BADANIA PRZY DAWCE WYJŚCIOWEJ 50 MG/KG MASY CIAŁA



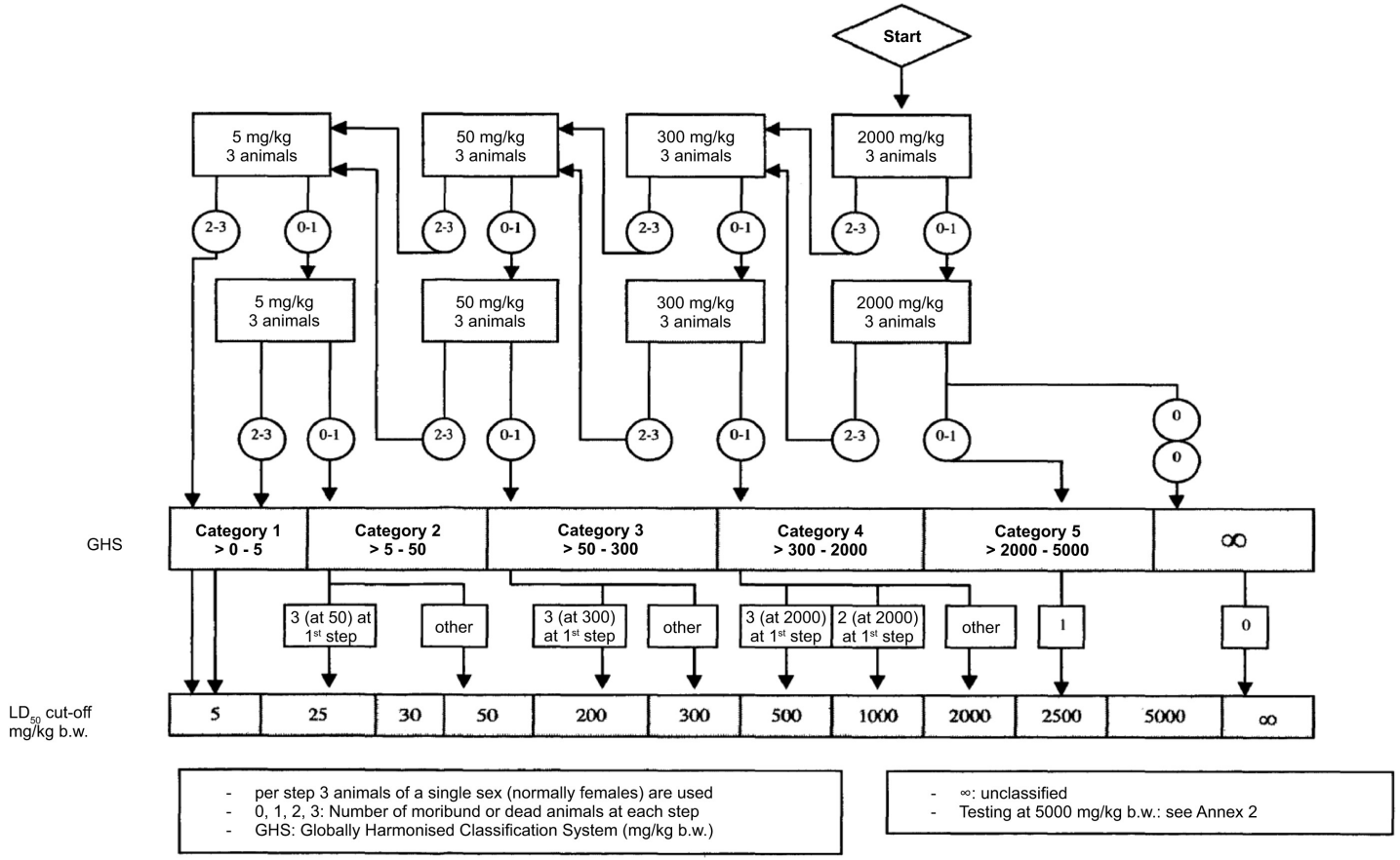
ZAŁĄCZNIK 1C

PROCEDURA BADANIA PRZY DAWCE WYJŚCIOWEJ 300 MG/KG MASY CIAŁA



ZAŁĄCZNIK 1D

PROCEDURA BADANIA PRZY DAWCE WYJŚCIOWEJ 2 000 MG/KG MASY CIAŁA



▼B

ZAŁĄCZNIK 2

KRYTERIA KLASYFIKACJI SUBSTANCJI BADANYCH O OCZEKIWANYCH WARTOŚCIACH LD_{50} PRZEKRACZAJĄCYCH 2 000 mg/kg, Z POMINIĘCIEM BADAŃ

Kryteria kategorii niebezpieczeństwa 5 mają w zamierzeniu umożliwiać identyfikację substancji badanych, które charakteryzują się niskim niebezpieczeństwem ostrej toksyczności, lecz które, w określonych okolicznościach mogą okazać się niebezpieczne dla populacji podatnych na zatrucie. Przewiduje się, że takie substancje charakteryzują się pokarmowym lub skórnym LD_{50} mieszczącym się w zakresie 2 000–5 000 mg/kg lub odpowiadają analogicznym dawkom w przypadku innych szlaków kontaktu z substancją. Substancja może zostać zaklasyfikowana do kategorii niebezpieczeństwa przy następujących cechach: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (kategoria 5 według GHS) w następujących przypadkach:

a) jeżeli została przypisana do tej kategorii w wyniku zastosowania jednego ze schematów przedstawionych w załącznikach 1a–1d, w oparciu o poziom śmiertelności;

b) jeżeli dostępne są wiarygodne dowody wskazujące, że LD_{50} powinno znaleźć się w obrębie kategorii 5; bądź jeżeli inne badania na zwierzętach lub ostre skutki u ludzi sugerują niebezpieczeństwo dla zdrowia ludzkiego spowodowane ostrym działaniem;

c) jeżeli okazuje się, w wyniku przeprowadzenia ekstrapolacji, szacunków lub pomiaru danych, że przypisanie do wyższej klasy niebezpieczeństwa nie jest uzasadnione oraz:

   — dostępne są wiarygodne informacje wskazujące na silne skutki toksyczne u ludzi, lub

   — zaobserwowano przypadki zgonu w toku pomiarów do wartości kategorii 4 w przypadku podania substancji droga pokarmową, lub

   — jeżeli ocena eksperta potwierdzi wyraźne kliniczne objawy toksyczności, w trakcie pomiarów do wartości kategorii 4, z wyjątkiem przypadków biegunki, piloerekcji lub wyglądu odbiegającego w sposób negatywny od normy, lub

   — jeżeli ocena eksperta potwierdzi wiarygodność informacji wskazujących na potencjalne, znaczne, ostre działanie uzyskanych w wyniku innych badań na zwierzętach zwierząt.

BADANIA PRZY DAWKACH PRZEKRACZAJĄCYCH 2 000 MG/KG

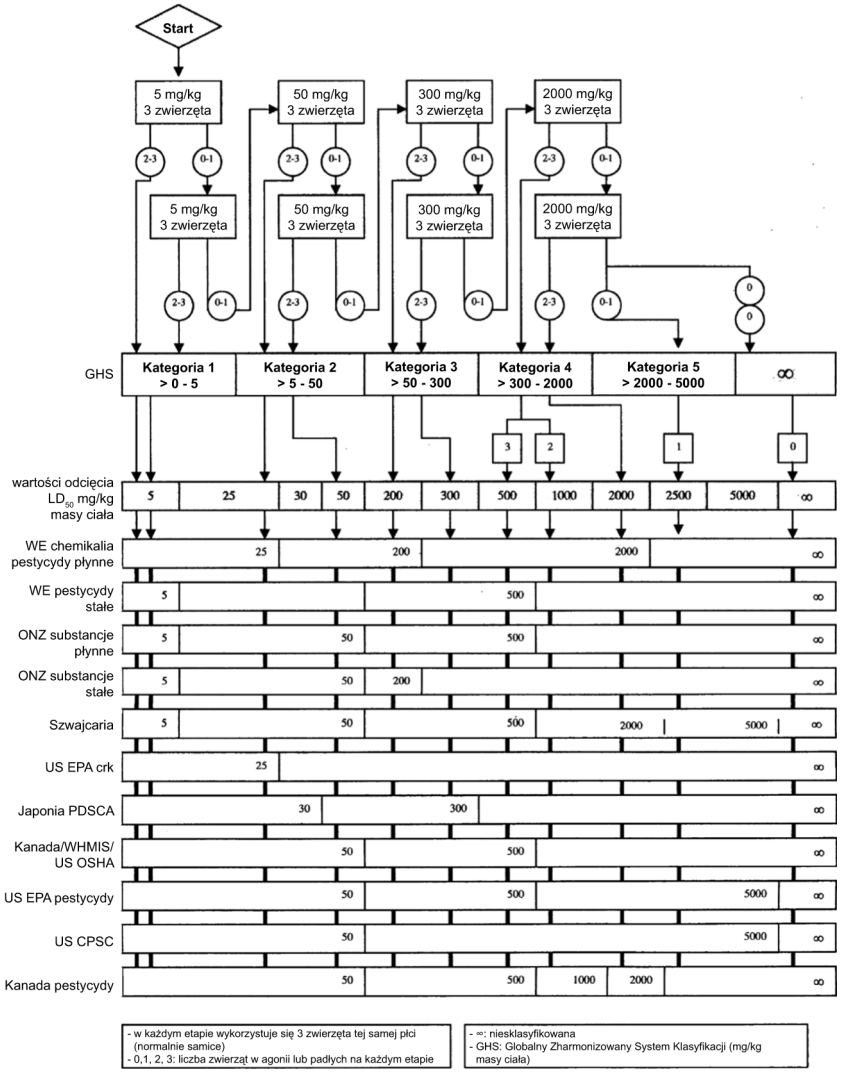
Uznając potrzebę dbałości o dobrostan zwierząt, badanie zwierząt w ramach kategorii 5 (5 000 mg/kg) jest odradzane i powinno być rozważane, wyłącznie jeżeli występuje wysokie prawdopodobieństwo, że wynik takich badań będzie miał bezpośredni wpływ na bezpieczeństwo i zdrowie ludzi i zwierząt (10). Nie należy prowadzić badań przy zastosowaniu wyższych poziomów dawek.

W przypadku konieczności przeprowadzenia badania przy zastosowaniu dawki 5 000 mg/kg wymagane jest przeprowadzenie jednego etapu (tj. przy wykorzystaniu trzech zwierząt). Jeżeli pierwsze zwierzę padnie, następnemu podaje się 2 000 mg/kg, zgodnie ze schematem działań zamieszczonym w załączniku 1. Jeżeli pierwsze zwierzę przeżyje, dawka podawana jest dwóm następnym. Jeżeli pada wyłącznie jedno zwierzę, przyjmuje się, że wartość LD_{50} przekracza 5 000 mg/kg. Jeżeli padają oba zwierzęta, podawanie kontynuuje się na poziomie 2 000 mg/kg.

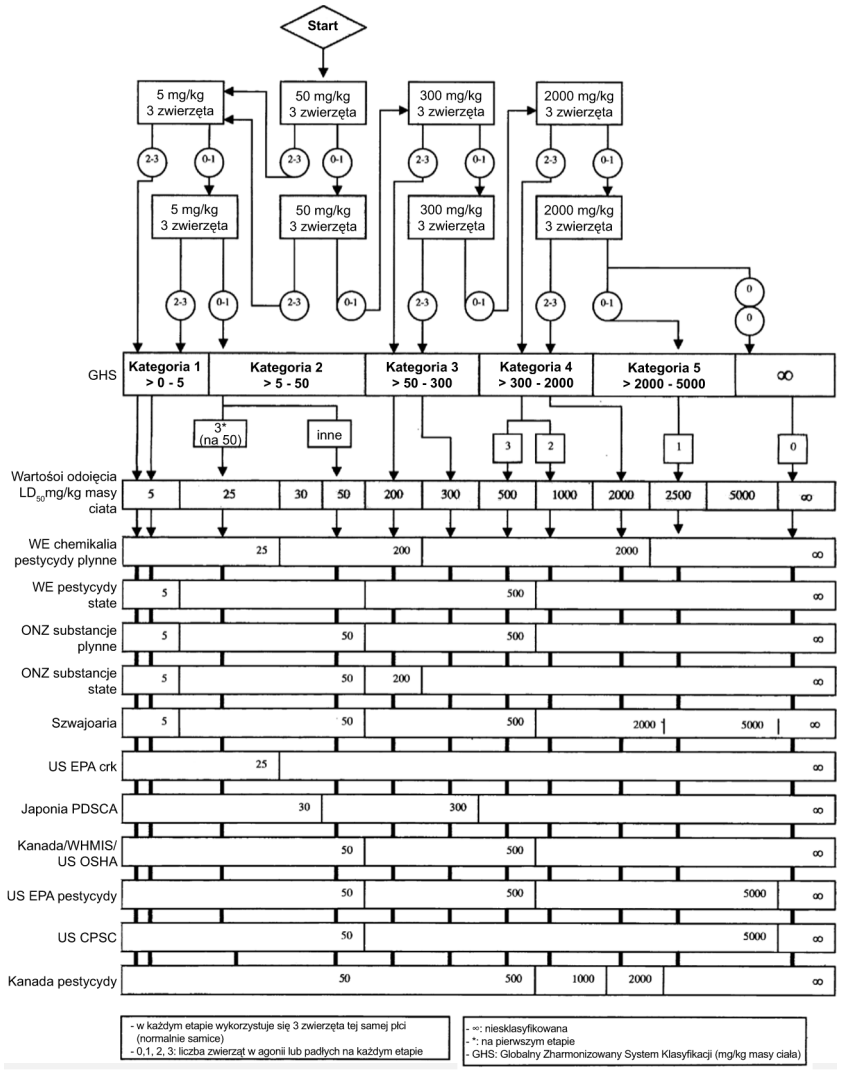
▼B

ZAŁĄCZNIK 3

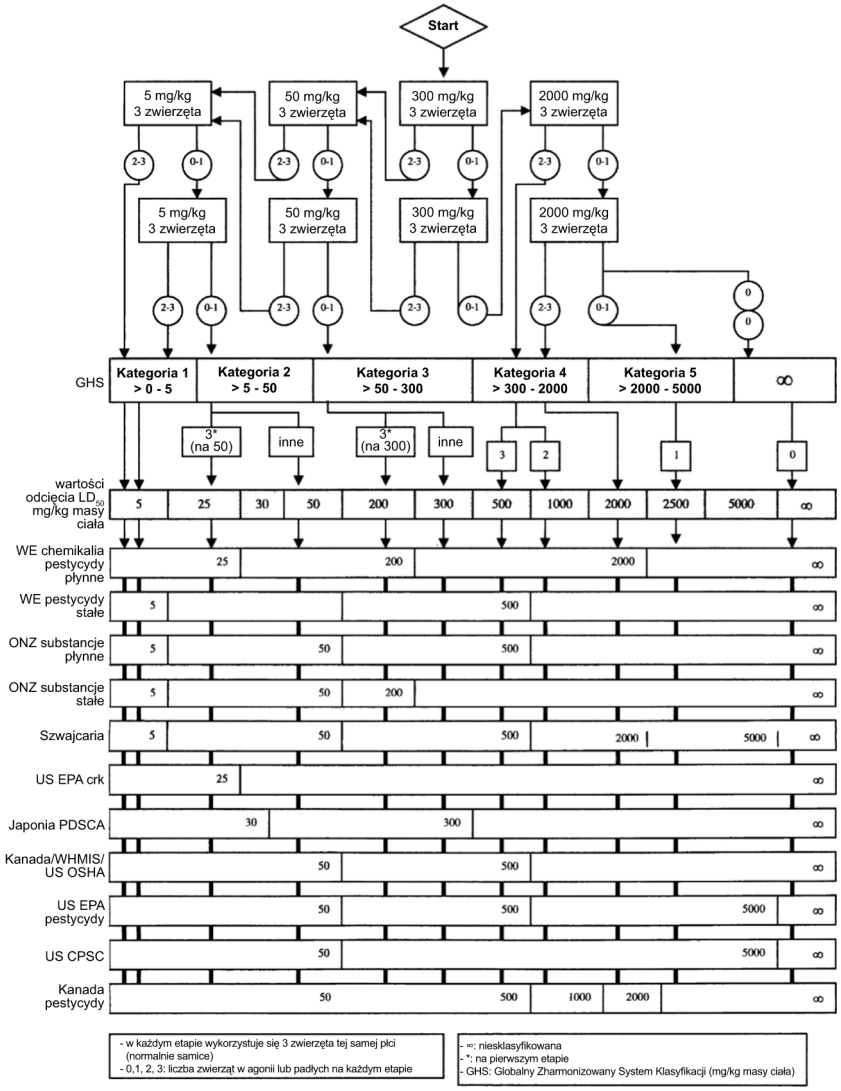
METODA BADAWCZA B.1 ter Wytyczne dotyczące klasyfikacji zgodnie z systemem WE obowiązującej w okresie przejściowym do momentu pełnego wdrożenia Globalnego Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji (GHS) (wytyczne pochodzą z pozycji bibliograficznej (8))



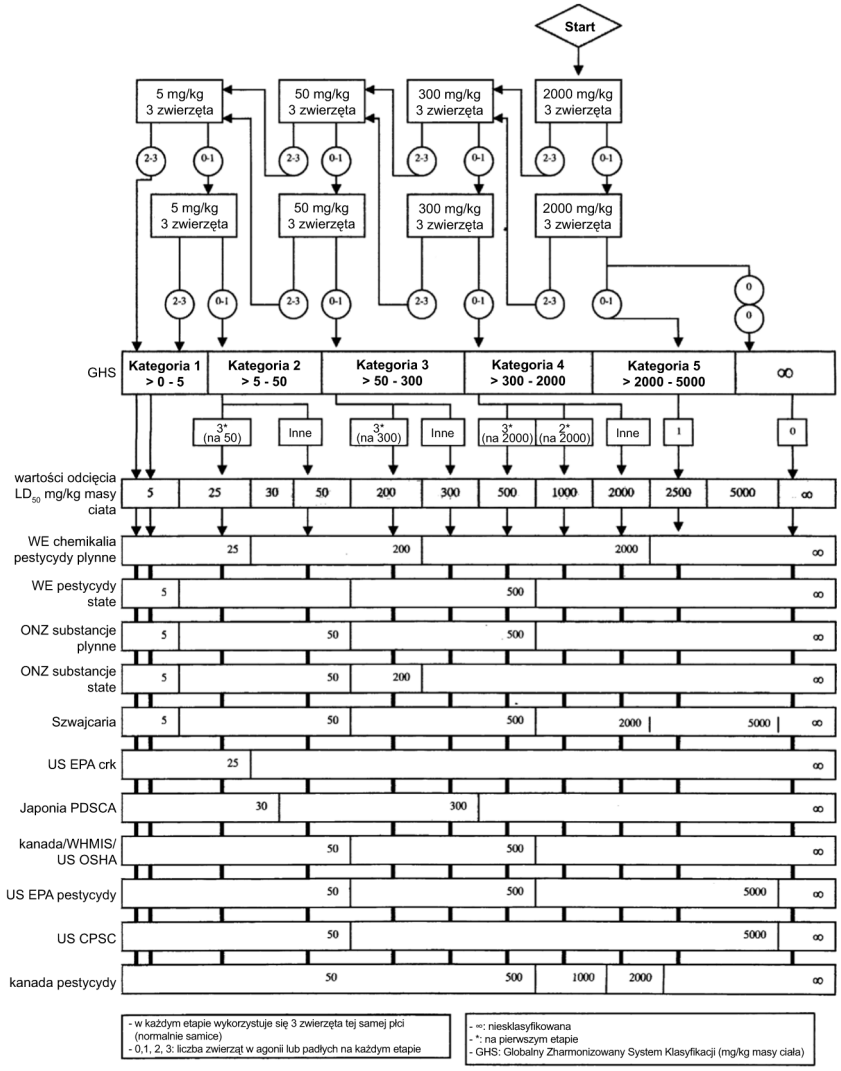
▼B


Start
5 mg/kg 3 zwierzęta
50 mg/kg 3 zwierzęta
300 mg/kg 3 zwierzęta
2000 mg/kg 3 zwierzęta
2-3
0-1
0
GHS
Kategoria 1 > 0 - 5
Kategoria 2 > 5 - 50
Kategoria 3 > 50 - 300
Kategoria 4 > 300 - 2000
Kategoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (na 50)
inne
Wartośoi odoięcia LD50mg/kg masy ciata
WE chemikalia pestycydy plynne
WE pestycydy state
ONZ substancje plynne
ONZ substancje state
Szwajoaria
US EPA crk
Japonia PDSCA
Kanada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pestycydy
US CPSC
Kanada pestycydy
- w każdym etapie wykorzystuje się 3 zwierzęta tej samej płci (normalnie samice)
- 0,1, 2, 3: liczba zwierząt w agonii lub padłych na każdym etapie
- ∞: niesklasyfikowana
- *: na pierwszym etapie
- GHS: Globalny Zharmonizowany System Klasyfikacji (mg/kg masy ciała)

▼B


Start
5 mg/kg 3 zwierzęta
50 mg/kg 3 zwierzęta
300 mg/kg 3 zwierzęta
2000 mg/kg 3 zwierzęta
2-3
0-1
0
GHS
Kategoria 1 > 0 - 5
Kategoria 2 > 5 - 50
Kategoria 3 > 50 - 300
Kategoria 4 > 300 - 2000
Kategoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (na 50)
inne
3* (na 300)
inne
3
2
1
0
wartości odcięcia LD_{50} mg/kg masy ciała
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
WE chemikalia pestycydy płynne
25 200 2000 ∞
WE pestycydy stałe
5 500 ∞
ONZ substancje płynne
5 50 500 ∞
ONZ substancje stałe
5 50 200 ∞
Szwajcaria
5 50 500 2000 5000 ∞
US EPA crk
25 ∞
Japonia PDSCA
30 300 ∞
Kanada/WHMIS/ US OSHA
50 500 ∞
US EPA pestycydy
50 500 5000 ∞
US CPSC
50 5000 ∞
Kanada pestycydy
50 500 1000 2000 ∞
- w każdym etapie wykorzystuje się 3 zwierzęta tej samej płci (normalnie samice)
- 0,1, 2, 3: liczba zwierząt w agonii lub padłych na każdym etapie
- ∞: niesklasyfikowana
- *: na pierwszym etapie
- GHS: Globalny Zharmonizowany System Klasyfikacji (mg/kg masy ciała)

▼B


Start
5 mg/kg 3 zwierzęta
50 mg/kg 3 zwierzęta
300 mg/kg 3 zwierzęta
2000 mg/kg 3 zwierzęta
2-3
0-1
0
GHS
Kategoria 1 > 0 - 5
Kategoria 2 > 5 - 50
Kategoria 3 > 50 - 300
Kategoria 4 > 300 - 2000
Kategoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (na 50)
Inne
3* (na 300)
3* (na 2000)
2* (na 2000)
1
wartości odcięcia LD_{50} mg/kg masy ciała
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
WE chemikalia pestycydy płynne
WE pestycydy stałe
ONZ substancje płynne
ONZ substancje stałe
Szwajcaria
US EPA crk
Japonia PDSCA
kanada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pestycydy
US CPSC
kanada pestycydy
- w każdym etapie wykorzystuje się 3 zwierzęta tej samej płci (normalnie samice)
- 0,1, 2, 3: liczba zwierząt w agonii lub padłych na każdym etapie
- =: niesklasyfikowana
- *: na pierwszym etapie
- GHS: Globalny Zharmonizowany System Klasyfikacji (mg/kg masy ciała)

▼M4

B.2. OSTRA TOKSYCZNOŚĆ INHALACYJNA

WSTĘP

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 403 (OECD TG 403) (2009) (1). Dotyczącą badań ostrej toksyczności inhalacyjnej wytyczną nr 403 (TG 403) przyjęto po raz pierwszy w 1981 r. Niniejsza zmieniona metoda badawcza B.2 (równoważna zmienionej wytycznej TG 403) została zaprojektowana jako bardziej elastyczna i mająca na celu zmniejszenie wykorzystania zwierząt oraz zaspokojenie potrzeb regulacyjnych. W ramach zmienionej metody badawczej przewidziano dwa rodzaje badań: tradycyjny protokół LC_{50} oraz protokół „stężenie × czas" (C × t). Podstawowe cechy niniejszej metody badawczej to możliwość uzyskania zależności stężenie-odpowiedź, od efektów nieletalnych po letalne, w celu wyprowadzenia mediany stężenia śmiertelnego (LC_{50}), stężenia progowego niepowodującego przypadków śmiertelnych (np. LC01) czy nachylenia krzywej, jak również w celu określenia potencjalnej podatności ze względu na płeć. Protokół C × t powinno się stosować wtedy, gdy istnieje szczególna, wynikająca z regulacji lub powodów naukowych potrzeba przeprowadzenia badań na zwierzętach z zastosowaniem wielu okresów trwania narażenia, np. do celów planowania działań w sytuacjach wyjątkowych [przykładowo do wyliczenia wartości dla wytycznych w sprawie poziomów narażenia ostrego (Acute Exposure Guideline Levels – AEGL), wytycznych w sprawie planowania działań w sytuacjach wyjątkowych (Emergency Response Planning Guidelines – ERPG) bądź poziomów progowych dla narażenia ostrego (Acute Exposure Threshold Levels – AETL)], czy też do celów zagospodarowania przestrzennego.

2. Wytyczne w sprawie przeprowadzania badań niniejszą metodą badawczą oraz interpretacji ich wyników można znaleźć w wytycznych dotyczących ostrej toksyczności inhalacyjnej (Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing) (GD 39) (2).

3. Definicje stosowane w kontekście niniejszej metody badawczej znajdują się na końcu tego rozdziału i w GD 39 (2).

4. Niniejsza metoda badawcza umożliwia scharakteryzowanie badanej substancji chemicznej oraz ilościową ocenę ryzyka, jak również pozwala na ocenę i klasyfikację badanych substancji chemicznych zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008 (3). W dokumencie GD 39 (2) znajdują się wytyczne dotyczące wyboru odpowiedniej metody badawczej dla badania toksyczności ostrej. W przypadku gdy potrzebne są tylko informacje dotyczące klasyfikacji i oznakowania, zasadniczo zalecany jest rozdział B.52 niniejszego załącznika (4) [zob. GD 39 [2]). Niniejsza metoda badawcza B.2 nie jest przeznaczona konkretnie do badania materiałów specjalnych, takich jak słabo rozpuszczalne materiały izometryczne lub włókniste czy też wytworzone nanomateriały.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

5. Aby zminimalizować wykorzystanie zwierząt, przed rozważeniem wykonania badań według niniejszej metody badawczej laboratorium przeprowadzające badanie powinno wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej, w tym wyniki istniejących badań (np. wykonanych metodą B.52 opisaną w niniejszym załączniku (4)), dzięki którym można byłoby uniknąć wykonywania dodatkowych badań. Informacje, które mogą być pomocne w doborze najbardziej odpowiedniego gatunku, szczepu, płci i sposobu narażenia oraz odpowiednich stężeń do badania obejmują nazwę, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*; spodziewane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR oraz dane toksykologiczne na temat strukturalnie powiązanych związków [zob. GD 39 (2)].

▼M4

6. Należy w zakresie, w jakim jest to możliwe, unikać badania żrących lub drażniących substancji chemicznych w stężeniach, które mogą powodować silny ból lub stres. Potencjalne działanie żrące/drażniące należy ocenić na podstawie specjalistycznej wiedzy, wykorzystując dowody, takie jak doświadczenia z badań na ludziach i zwierzętach (np. z użyciem dawki powtarzanej w stężeniach, w których dana substancja nie jest żrąca/nie powoduje podrażnienia), istniejących danych *in vitro* (np. uzyskanych metodami z rozdziałów B.40 (5), B.40bis (6) niniejszego załącznika lub z wytycznej OECD TG 435 (7)), wartości pH, informacji dotyczących podobnych substancji lub wszelkich innych odnośnych danych, tak aby zbadać możliwość rezygnacji z dalszych badań. Dla zaspokojenia szczególnych potrzeb regulacyjnych (np. do celów planowania działań w sytuacjach wyjątkowych) można użyć niniejszej metody badawczej przy poddawaniu zwierząt działaniu tych materiałów, ponieważ daje to kierownikowi badania bądź głównemu badaczowi kontrolę nad wyborem stężeń docelowych. Stężenia te nie powinny jednak mieć działania podrażniającego/żrącego, ale powinny być wystarczające do przedłużenia krzywej stężenie-odpowiedź do poziomu, przy którym zostanie osiągnięty cel regulacyjny i naukowy danego badania. Stężenia należy dobierać indywidualnie w każdym przypadku, a wybór uzasadniać [zob. GD 39 (2)].

ZASADA BADANIA

7. Niniejsza zmieniona metoda badawcza B.2 została zaprojektowana w celu uzyskania wystarczających informacji na temat ostrej toksyczności badanej substancji chemicznej w celu umożliwienia jej klasyfikacji i otrzymania danych dotyczących śmiertelności (np. LC_{50}, LC_{01} i nachylenia) dla jednej lub obu płci, potrzebnych do ilościowych ocen ryzyka. Niniejsza metoda badawcza obejmuje dwie metody. Pierwsza z nich to protokół tradycyjny, w którym grupy zwierząt narażane są na działanie stężenia granicznego (badanie graniczne) lub szeregu stężeń w procedurze sekwencyjnej przez określony z góry czas, zazwyczaj 4 godziny. Dla poszczególnych celów regulacyjnych mogą obowiązywać inne czasy trwania narażenia. Druga metoda to protokół (C x t), w ramach którego grupy zwierząt naraża się na działanie jednego stężenia (stężenia granicznego) lub szeregu różnych stężeń przez różny czas.

8. Zwierzęta w stanie agonalnym lub zwierzęta wykazujące oczywiste oznaki bólu czy oznaki ostrego i przewlekłego stresu powinny zostać uśmiercone w humanitarny sposób i uwzględnione w interpretacji wyników badań w ten sam sposób, co zwierzęta padłe w trakcie badania. Kryteria podejmowania decyzji co do uśmiercenia zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących silny ból oraz wytyczne dotyczące rozpoznawania prognozowanego lub nieuchronnie zbliżającego się zgonu są zawarte w dotyczących humanitarnego punktu końcowego wytycznych OECD nr 19 (8).

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

9. Zaleca się użycie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt pochodzących ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratorium. Preferowanym gatunkiem jest szczur, a w przypadku wykorzystania innego gatunku należy podać uzasadnienie.

Przygotowanie zwierząt

10. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. W dniu narażenia zwierzęta powinny być młodymi dorosłymi osobnikami w wieku 8–12 tygodni, a ich masa ciała powinna mieścić się w zakresie ± 20 % średniej masy dla każdej płci zwierząt w tym samym wieku poddanych uprzednio narażeniu. Zwierzęta wybiera się losowo i oznacza w sposób umożliwiający identyfikację poszczególnych osobników. Zwierzęta przetrzymuje się w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem badania, aby umożliwić ich aklimatyzację do warunków laboratoryjnych. Zwierzęta powinny również być przyzwyczajane do przyrządów używanych w badaniu przez krótki okres przed badaniem, ponieważ zmniejszy to ich stres spowodowany wprowadzeniem do nowego środowiska.

▼M4

Hodowla zwierząt

11. Temperatura w pomieszczeniach, w których przebywają zwierzęta doświadczalne, powinna wynosić 22 ± 3 °C. Najlepiej byłoby, gdyby wilgotność względna była utrzymywana w przedziale 30–70 %, chociaż może to być niemożliwe w przypadku stosowania wody jako nośnika. Przed narażeniem i po nim zwierzęta powinny zasadniczo być trzymane w klatkach w grupach podzielonych ze względu na płeć i badane stężenie, ale liczba zwierząt w klatce nie powinna zakłócać możliwości obserwacji każdego zwierzęcia i powinna być taka, aby zminimalizować straty spowodowane kanibalizmem i walkami. Jeżeli zwierzęta mają być poddane narażeniu tylko przez nos, konieczne może być przyzwyczajenie ich do rur unieruchamiających. Rury unieruchamiające nie powinny powodować nadmiernego stresu fizycznego i termicznego dla zwierząt ani stresu spowodowanego unieruchomieniem. Unieruchomienie może mieć wpływ na fizjologiczne punkty końcowe, takie jak temperatura ciała (hipertermia) lub minutowa pojemność oddechowa. Jeżeli dostępne są dane ogólne, na podstawie których można wykazać, że takie zmiany nie występują w znaczącym stopniu, uprzednia adaptacja do rur unieruchamiających nie jest konieczna. Zwierzęta, których cała powierzchnia ciała jest narażana na działanie aerozolu, w trakcie narażenia powinny być trzymane oddzielnie, aby zapobiec filtrowaniu badanego aerozolu przez futro innych zwierząt w tej samej klatce. Można stosować pasze konwencjonalne oraz certyfikowane pasze laboratoryjne, z wyjątkiem okresów poddawania narażeniu, należy także zapewnić nieograniczony dostęp do wody pitnej z instalacji wodociągowej. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności.

Komory inhalacyjne

12. Przy wyborze komory inhalacyjnej należy wziąć pod uwagę charakter badanej substancji chemicznej i cel badania. Preferowaną drogą narażenia jest narażenie tylko przez nos (pojęcie to obejmuje narażenie tylko głowy, narażenie tylko przez nos lub narażenie tylko pyska). Narażenie tylko przez nos jest na ogół preferowane w badaniach aerozoli ciekłych lub stałych oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole. Narażenie całego ciała może bardziej sprzyjać osiągnięciu szczególnych celów badania, taki wybór należy jednak uzasadnić w sprawozdaniu z badania. Aby zagwarantować stabilność atmosfery przy zastosowaniu komory do poddawania narażeniu całego ciała, łączna objętość badanych zwierząt nie powinna przekraczać 5 % objętości komory. Zasady technik narażenia tylko przez nos oraz przez powierzchnię całego ciała oraz ich szczególne zalety i wady omówiono w GD 39 (2).

WARUNKI NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Stosowanie stężeń

13. Narażenie tylko przez nos w przypadku szczurów może trwać do 6 godzin. Jeżeli narażeniu tylko przez nos poddaje się myszy, czas narażenia nie powinien zasadniczo przekraczać 4 godzin. Jeżeli potrzebne są badania z dłuższym czasem trwania narażenia, należy podać uzasadnienie [zob. GD 39 (2)]. Zwierzęta poddane działaniu aerozoli w komorach do poddawania narażeniu całego ciała należy przetrzymywać pojedynczo, aby zapobiec połykaniu badanej substancji chemicznej przy wylizywaniu innych zwierząt znajdujących się w tej samej klatce. W okresie narażenia na działanie substancji należy wstrzymać podawanie paszy. Podczas poddawania narażeniu całego ciała można zapewnić dostęp do wody.

14. Zwierzęta są poddawane narażaniu na działanie badanej substancji chemicznej w postaci gazu, pary, aerozolu lub mieszaniny tych postaci. Stan fizyczny, który ma być przedmiotem badania, zależy od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, wybranego stężenia lub formy fizycznej, która najprawdopodobniej będzie występować podczas postępowania z badaną substancją chemiczną i jej stosowania. Substancje chemiczne o charakterze higroskopijnym oraz chemicznie reaktywne należy badać w suchej atmosferze. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć osiągnięcia stężenia wybuchowego.

▼M4

Rozkład wielkości cząstek

15. W odniesieniu do wszystkich aerozoli oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole, należy dokonać klasyfikacji cząstek według wielkości. W celu umożliwienia narażenia wszystkich odpowiednich części dróg oddechowych na działanie danej substancji zaleca się aerozole o średnicy aerodynamicznej mediany rozkładu masowego (MMAD) wynoszącej od 1 do 4 μm przy geometrycznym standardowym odchyleniu (σ_g) równym od 1,5 do 3,0 (2) (9) (10). Należy dołożyć uzasadnionych starań, aby spełnić tę normę, jednak w razie niemożności jej osiągnięcia należy przedstawić ocenę eksperta. Przykładowo pary metali mogą zawierać cząstki mniejsze, niż przewiduje to norma, a cząstki naładowane, włókna i materiały higroskopijne (których rozmiar zwiększa się w wilgotnym środowisku układu oddechowego) mogą tę normę przekraczać.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej w nośniku

16. Do uzyskania odpowiedniego stężenia i rozmiaru cząstek badanej substancji chemicznej w atmosferze można zastosować nośnik. Zasadniczo preferowanym nośnikiem powinna być woda. Materiały stałe można poddać obróbce mechanicznej w celu uzyskania wymaganego rozkładu wielkości cząstek, jednak należy zachować ostrożność, aby badana substancja chemiczna nie uległa rozkładowi ani zmianom. W przypadkach, w których można przypuszczać, że w wyniku procesów mechanicznych zmienił się skład badanej substancji chemicznej (np. w ekstremalnych temperaturach powstających na skutek tarcia przy nadmiernie intensywnym mieleniu), należy go zweryfikować metodami analitycznymi. Należy dołożyć odpowiednich starań, aby uniknąć zanieczyszczenia badanej substancji chemicznej. Nie ma potrzeby badania materiałów granulowanych niemających charakteru sypkiego, które są celowo przygotowywane tak, aby nie ulegały wdychaniu. Należy wykonać próbę na ścieranie w celu wykazania, że przy postępowaniu z materiałem granulowanym nie powstają cząstki respirabilne. Jeżeli w wyniku próby na ścieranie powstaną substancje respirabilne, należy wykonać badanie toksyczności inhalacyjnej.

Zwierzęta kontrolne

17. Wykorzystanie równoległej ujemnej (poddanej działaniu powietrza) grupy kontrolnej nie jest konieczne. W przypadku wykorzystania nośnika innego niż woda w celu wytworzenia atmosfery na potrzeby badania należy użyć grupy kontrolnej nośnika tylko wtedy, gdy brak jest dostępnych danych historycznych na temat toksyczności inhalacyjnej. Jeżeli badanie toksyczności dla badanej substancji chemicznej zmieszanej z nośnikiem nie wykaże toksyczności, wynika z tego, że dany nośnik jest nietoksyczny w badanych stężeniach, a zatem nie ma potrzeby tworzenia grupy kontrolnej nośnika.

MONITOROWANIE WARUNKÓW NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Przepływ powietrza w komorze

18. Przepływ powietrza przez komorę należy starannie kontrolować i monitorować w sposób ciągły, jak również rejestrować podczas narażania na działanie substancji nie rzadziej niż co godzinę. Monitorowanie stężenia (lub stabilności) w atmosferze uzyskanej na potrzeby badania jest pomiarem całościowym wszystkich parametrów dynamicznych i umożliwia w sposób pośredni kontrolę wszystkich istotnych parametrów dynamicznych w zakresie generowania atmosfery. Należy w szczególności uwzględnić kwestię zapobiegania ponownemu wdychaniu w komorach przeznaczonych do narażenia wyłącznie przez nos w przypadkach, gdy przepływ powietrza przez układ podawania substancji jest nieodpowiedni do zapewnienia dynamicznego przepływu powietrza zawierającego badaną substancję chemiczną. Istnieją zalecane metody, które można zastosować do wykazania, że w wybranych warunkach ponowne wdychanie nie zachodzi (2) (11). Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 19 %, a stężenie dwutlenku węgla nie powinno przekraczać 1 %. Jeżeli istnieje uzasadnione przypuszczenie, że norm tych nie da się spełnić, należy mierzyć stężenia tlenu i dwutlenku węgla.

▼M4

Temperatura i wilgotność względna w komorze

19. W komorze należy utrzymywać temperaturę na poziomie 22 ± 3 °C. Wilgotność względną w strefie oddychania zwierząt – zarówno dla narażenia tylko przez nos, jak i dla narażenia całego ciała – należy monitorować i rejestrować co najmniej trzykrotnie podczas okresów poddawania działaniu substancji trwających do 4 godzin, a podczas okresów krótszych – co godzinę. Należy utrzymywać wilgotność względną w przedziale 30–70 %, choć może to być nieosiągalne (np. przy badaniu mieszanin na bazie wody) lub niemożliwe do zmierzenia w przypadku zakłócenia danej metody badawczej przez badaną substancję chemiczną.

Badana substancja chemiczna: stężenie nominalne

20. Tam, gdzie to możliwe, należy obliczyć i zarejestrować stężenie nominalne w komorze badawczej. Stężenie nominalne jest to masa wytworzonej badanej substancji chemicznej podzielona przez całkowitą objętość powietrza, które przeszło przez układ komory. Stężenie nominalne nie służy do charakterystyki narażenia zwierząt – porównanie stężenia nominalnego i rzeczywistego stanowi wskazówkę co do efektywności wytwarzania w układzie doświadczalnym, a zatem można je wykorzystać do wykrycia problemów związanych z wytwarzaniem.

Badana substancja chemiczna: stężenie rzeczywiste

21. Stężenie rzeczywiste jest to stężenie badanej substancji chemicznej w strefie oddychania zwierząt w komorze inhalacyjnej. Stężenia rzeczywiste można uzyskać metodami swoistymi (np. bezpośrednie pobieranie próbek, metody adsorpcyjne lub z wykorzystaniem reaktywności chemicznej, a następnie badanie metodami analitycznymi) lub nieswoistymi, takimi jak analiza grawimetryczna przy zastosowaniu filtra. Zastosowanie metody grawimetrycznej jest akceptowalne tylko w przypadku aerozoli proszkowych zawierających jeden składnik lub aerozoli cieczy o niskiej lotności i należy wtedy przed badaniem wykonać odpowiednią analizę, swoistą dla badanej substancji chemicznej. Za pomocą metody grawimetrycznej można również określić stężenie wieloskładnikowego aerozolu proszkowego. Do tego są jednak konieczne dane analityczne, za pomocą których można wykazać, że skład materiału znajdującego się w powietrzu jest podobny do składu materiału wyjściowego. W razie braku takich informacji może być konieczna ponowna analiza badanej substancji chemicznej (najlepiej znajdującej się w powietrzu) w toku badania, w regularnych odstępach czasowych. W przypadku środków w formie aerozoli, które mogą ulec odparowaniu lub sublimacji, należy wykazać, że przy zastosowaniu wybranej metody zebrano wszystkie fazy. W sprawozdaniu z badania należy podać stężenia docelowe, nominalne i rzeczywiste, ale w analizach statystycznych do wyliczenia wartości stężeń śmiertelnych uwzględnia się tylko stężenia rzeczywiste.

22. Jeżeli to możliwe, należy używać badanej substancji chemicznej pochodzącej z jednej partii, a badaną próbkę należy przechowywać w warunkach zapewniających jej czystość, jednorodność i stabilność. Przed rozpoczęciem badania należy scharakteryzować badaną substancję chemiczną, w tym jej czystość, oraz, o ile jest to wykonalne z technicznego punktu widzenia, określić tożsamość oraz ilości zidentyfikowanych domieszek i zanieczyszczeń. Można to wykazać, między innymi, za pomocą następujących danych: czasu retencji i względnej powierzchni sygnału, masy cząsteczkowej uzyskanej w drodze spektrometrii masowej lub chromatografii gazowej bądź innych oszacowań. Mimo że identyfikacja badanej próbki nie należy do obowiązków laboratorium badawczego, rozsądne może być potwierdzenie przez to laboratorium charakterystyki, którą przedstawił sponsor, przynajmniej w ograniczonym zakresie (np. koloru, cech fizycznych itp.).

23. Podczas badania należy utrzymywać możliwie niezmienną atmosferę i monitorować ją stale lub co pewien czas, w zależności od metody analitycznej. Jeżeli stosuje się pobieranie próbek co pewien czas, podczas czterogodzinnego badania należy pobierać próbki powietrza w komorze nie rzadziej niż dwa razy podczas badania. Jeżeli z powodu ograniczonej prędkości przepływu powietrza lub niskich stężeń jest to niemożliwe, można pobrać jedną

▼M4

próbkę na cały okres narażenia. W razie wystąpienia znacznych fluktuacji pomiędzy próbkami dla kolejnych badanych stężeń należy pobrać cztery próbki na okres narażenia. Wartości stężeń w komorze dla poszczególnych próbek nie powinny odbiegać od stężenia średniego o więcej niż ± 10 % dla gazów i par oraz o więcej niż ± 20 % dla aerozoli ciekłych lub stałych. Należy obliczyć i zapisać okres wyrównania stężeń w komorze (t_{95}). Czas trwania narażenia obejmuje czas wprowadzania badanej substancji chemicznej do komory przy uwzględnieniu czasu potrzebnego do osiągnięcia t_{95}. Wytyczne dotyczące szacowania t_{95} można znaleźć w GD 39 (2).

24. W przypadku bardzo złożonych mieszanin składających się z gazów/par i aerozoli (np. w przypadku atmosfery spalania i badanych substancji chemicznych wydzielanych ze specjalnych produktów/urządzeń do zastosowania końcowego) każda faza może zachowywać się inaczej w komorze inhalacyjnej, należy zatem wybrać co najmniej jedną substancję wskaźnikową (analit) z każdej fazy (gaz/para i aerozol) – zazwyczaj jest to główna substancja czynna mieszaniny. Jeżeli badana substancja chemiczna jest mieszaniną, należy podać stężenie analityczne w odniesieniu do całej mieszaniny, a nie tylko substancji czynnej lub składnika aktywnego (analitu). Dodatkowe informacje na temat stężeń rzeczywistych można znaleźć w GD 39 (2).

Badana substancja chemiczna: Rozkład wielkości cząstek

25. Rozkład wielkości cząstek aerozoli należy określać co najmniej dwa razy podczas każdego czterogodzinnego okresu narażenia za pomocą impaktora kaskadowego lub innego instrumentu, takiego jak aerodynamiczny spektrometr pomiaru cząstek. Jeżeli można wykazać równoważność wyników uzyskanych za pośrednictwem impaktora kaskadowego lub innego instrumentu, ten inny instrument może być stosowany przez cały okres badania. W celu potwierdzenia sprawności zatrzymywania cząstek przez instrument główny należy równolegle do tego instrumentu stosować drugie urządzenie, takie jak filtr grawimetryczny lub odpylacz/bełkotkę. Stężenie masowe uzyskane na podstawie analizy wielkości cząstek powinno mieścić się w rozsądnych granicach stężenia masowego uzyskanego poprzez analizę filtrów [zob. GD 39 (2)]. Jeśli można wykazać równoważność w początkowej fazie badania, dalsze pomiary potwierdzające można pominąć. Ze względu na dobrostan zwierząt należy podjąć środki mające na celu zminimalizowanie ilości danych niejednoznacznych, które mogą prowadzić do konieczności powtórzenia narażenia. Klasyfikację cząstek według wielkości należy przeprowadzić w odniesieniu do par, jeżeli istnieje jakakolwiek możliwość tworzenia się aerozolu wskutek kondensacji par lub jeśli cząstki są wykrywane w atmosferze parowej mającej potencjał tworzenia faz mieszanych (zob. pkt 15).

PROCEDURA

26. Poniżej opisano dwa rodzaje badań: protokół tradycyjny oraz protokół C × t. Oba protokoły mogą obejmować badanie rozpoznawcze, badanie główne lub badanie graniczne (protokół tradycyjny) albo badanie przy stężeniu granicznym (C × t). Jeżeli wiadomo, że podatność zależy od płci, kierownik badania może zdecydować o przeprowadzeniu badań przy użyciu tylko osobników tej płci, która jest bardziej podatna. Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu tylko przez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. Przed rozpoczęciem badania należy uwzględnić wszelkie dostępne dane w celu zminimalizowania wykorzystania zwierząt. Przykładowo dzięki danym powstałym przy użyciu metody B.52 opisanej w niniejszym załączniku (4) można wyeliminować potrzebę przeprowadzenia badania rozpoznawczego oraz wykazać większą podatność którejś z płci [zob. GD 39 (2)].

▼M4

PROTOKÓŁ TRADYCYJNY

Zasady ogólne: protokół tradycyjny

27. W badaniu zgodnie z protokołem tradycyjnym grupy zwierząt poddawane są działaniu badanej substancji chemicznej przez określony czas (zazwyczaj 4 godziny) tylko przez nos lub w komorze do poddawania narażeniu całego ciała. Zwierzęta poddawane są działaniu stężenia granicznego (badanie graniczne) lub działaniu co najmniej trzech stężeń w procedurze sekwencyjnej (badanie główne). Przed badaniem głównym można przeprowadzić badanie rozpoznawcze, chyba że istnieją już pewne informacje dotyczące badanej substancji chemicznej, takie jak uprzednio przeprowadzone badanie metodą B.52 [zob. GD 39 (2)].

Badanie rozpoznawcze: protokół tradycyjny

28. Badanie rozpoznawcze służy do oszacowania siły działania badanej substancji chemicznej, identyfikacji związanych z płcią różnic w podatności oraz pomocniczo w doborze poziomów stężenia podczas narażenia dla badania głównego lub badania granicznego. Przy wyborze poziomów stężenia na potrzeby badania rozpoznawczego należy wykorzystać wszystkie dostępne informacje, w tym dostępne dane dotyczące (Q)SAR i podobnych chemikaliów. Na działanie każdego stężenia należy narażać nie więcej niż trzech samców i trzy samice (trzy zwierzęta każdej płci mogą być potrzebne do ustalenia zróżnicowania podatności pomiędzy płciami). Badanie rozpoznawcze może obejmować jedno stężenie, ale w razie potrzeby można zbadać więcej stężeń. Badanie rozpoznawcze nie powinno przypominać badania głównego pod względem liczby badanych zwierząt i użytych stężeń. W miejsce badania rozpoznawczego można wykorzystać uprzednio przeprowadzone badanie metodą B.52 (4) [zob. GD 39 (2)].

Badanie graniczne: protokół tradycyjny

29. Badanie graniczne stosuje się wtedy, gdy badana substancja chemiczna jest znana lub można się spodziewać, że jest ona praktycznie nietoksyczna, tzn. powoduje efekt toksyczny dopiero powyżej stężenia granicznego przewidzianego przepisami. W badaniu granicznym pojedynczą grupę składającą się z trzech samców i trzech samic poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej w stężeniu granicznym. Informacje na temat toksyczności badanej substancji chemicznej można uzyskać na podstawie wiedzy na temat podobnych zbadanych chemikaliów, z uwzględnieniem tożsamości i zawartości procentowej składników, o których wiadomo, że mają znaczenie z punktu widzenia toksyczności. W sytuacji niewystarczającej ilości lub braku informacji na temat toksyczności badanej substancji chemicznej lub w przypadku, gdy substancja ta zgodnie z oczekiwaniami może być toksyczna, należy przeprowadzić badanie główne.

30. Dobór stężeń granicznych zazwyczaj zależy od wymogów regulacyjnych. Jeśli stosowane jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008, stężenia graniczne dla gazów, par i aerozoli wynoszą odpowiednio 20 000 ppm, 20 mg/l i 5 mg/l (lub maksymalne stężenie możliwe do uzyskania) (3). W przypadku niektórych badanych substancji chemicznych wytworzenie stężeń granicznych może być trudne technicznie, w szczególności dla substancji występujących w postaci par i aerozoli. Przy badaniu aerozoli celem podstawowym powinno być osiągnięcie takiego rozmiaru cząstek, aby mogły one ulec wdychaniu (MMAD od 1 do 4 μm). Dla większości badanych substancji chemicznych jest to możliwe przy stężeniu 2 mg/l. Próby badania aerozoli przy stężeniu większym niż 2 mg/l należy przeprowadzać tylko w przypadku, gdy możliwe jest uzyskanie cząstek o rozmiarze takim, aby mogły ulec wdychaniu [zob. GD 39 (2)]. W rozporządzeniu (WE) nr 1272/2008 nie zaleca się badań z użyciem stężeń większych od stężenia granicznego ze względu na dobrostan zwierząt (3). Stężenie graniczne należy brać pod uwagę tylko w przypadku znacznego prawdopodobieństwa, że wyniki takich badań przyniosą bezpośrednie korzyści dla ochrony zdrowia ludzi (3), a w sprawozdaniu z badania należy podać uzasadnienie. W przypadku badanych substancji chemicznych, które są potencjalnie wybuchowe, należy dołożyć starań w celu uniknięcia warunków sprzyjających wybuchowi. Aby uniknąć zbędnego wykorzystywania zwierząt, należy przed badaniem granicznym przeprowadzić test próbny bez udziału zwierząt w celu upewnienia się, że warunki w komorze do przeprowadzenia badania granicznego są możliwe do osiągnięcia.

▼M4

31. Jeżeli przy stężeniu granicznym obserwowana jest śmiertelność lub stany agonalne, wyniki badania granicznego mogą pełnić rolę badania rozpoznawczego dla dalszych badań przy innych stężeniach (zob. badanie główne). Jeżeli właściwości fizyczne lub chemiczne badanej substancji chemicznej uniemożliwiają osiągnięcie stężenia granicznego, należy przeprowadzić badanie przy maksymalnym osiągalnym stężeniu. Jeżeli przy maksymalnym osiągalnym stężeniu występuje śmiertelność mniejsza niż 50 %, dalsze badania nie są konieczne. Jeżeli uzyskanie stężenia granicznego było niemożliwe, w sprawozdaniu z badania należy to wyjaśnić i na dowód podać odpowiednie dane. Jeżeli maksymalne możliwe do uzyskania stężenie pary nie wywołuje toksyczności, może być konieczne podanie badanej substancji chemicznej jako aerozolu ciekłego.

Badanie główne: protokół tradycyjny

32. Badanie główne wykonuje się zazwyczaj przy wykorzystaniu pięciu samców i pięciu samic (lub 5 zwierząt płci podatnej na działanie substancji, jeśli jest znana) na każdy poziom stężenia i dla co najmniej trzech stężeń. Należy użyć poziomów stężeń wystarczających do wykonania rzetelnej analizy statystycznej. Odstępy czasowe między podawaniem dawek w każdej grupie poddawanej narażeniu określa się na podstawie czasu wystąpienia, długości trwania i ostrości oznak toksyczności. Należy odwlec narażenie zwierząt na działanie kolejnego stężenia do momentu, gdy można w sposób uzasadniony uznać, że uprzednio badane zwierzęta przeżyły. Dzięki temu kierownik badania może dopasować stężenie docelowe dla kolejnej grupy poddawanej narażeniu. Jednak z powodu zależności od zaawansowanych technologii rozwiązanie takie nie zawsze daje się w praktyce zastosować podczas badań toksyczności inhalacyjnej, zatem o narażeniu zwierząt na działanie substancji przy kolejnym poziomie stężenia należy zdecydować na podstawie uprzednich doświadczeń i osądu naukowego. W przypadku badania mieszanin należy wziąć pod uwagę GD 39 (2).

PROTOKÓŁ „STĘŻENIE × CZAS” (C × t)

Zasady ogólne: protokół C × t

33. Alternatywą dla protokołu tradycyjnego przy ocenie toksyczności inhalacyjnej może być wykonywane w procedurze sekwencyjnej badanie C × t (12) (13) (14). Metoda ta umożliwia narażanie zwierząt na działanie badanej substancji chemicznej przy wielu poziomach stężeń i przez wiele okresów trwania. Wszystkie badania przeprowadza się w komorze do poddawania narażeniu tylko przez nos (w tym protokole zastosowanie komór do poddawania narażeniu całego ciała byłoby niepraktyczne). Protokół zilustrowany jest diagramem w dodatku 1. Zgodnie z wynikami analizy symulacyjnej zarówno protokół tradycyjny, jak i protokół C × t mogą dawać odporne wartości LC_{50}, ale w wyniku zastosowania protokołu C × t uzyskuje się lepsze wartości LC_{01} i LC_{10} (15).

34. W analizie symulacyjnej wykazano, że przy badaniu 4 stężeń i 5 okresów narażenia w badaniu głównym zasadniczo odpowiednie może być wykorzystanie dwóch osobników na interwał C × t (jeden z każdej płci, jeśli wykorzystywane są samce i samice, lub dwa osobniki płci bardziej podatnej). W pewnych okolicznościach kierownik badania może zdecydować o wykorzystaniu dwóch szczurów każdej płci na interwał C × t (15). Dzięki wykorzystaniu dwóch osobników każdej płci na każdy punkt oznaczający dane stężenie przy danym czasie można zmniejszyć błędy systematyczne i zmienność szacunków, zwiększyć dokładność szacunków i poprawić przedział ufności. Jednak w przypadku, gdy rozrzut danych jest zbyt duży, aby wyprowadzić oszacowanie (przy wykorzystaniu jednego osobnika danej płci lub dwóch osobników płci bardziej podatnej) może wystarczyć również zastosowanie narażenia na działanie substancji przy piątej wartości stężenia. Dalsze wytyczne co do liczby zwierząt i stężeń, jakie mają być wykorzystane w badaniu C × t, znajdują się w GD 39 (2).

▼M4

Badanie rozpoznawcze: protokół C × t

35. Badanie rozpoznawcze służy do oszacowania siły działania badanej substancji chemicznej oraz pomocniczo w doborze poziomów stężenia podczas narażenia dla badania głównego. Aby dobrać odpowiednie stężenie początkowe do badania głównego i zminimalizować liczbę wykorzystanych zwierząt, może być potrzebne badanie rozpoznawcze przy wykorzystaniu do trzech zwierząt na płeć i stężenie [szczegóły można znaleźć w dodatku III do GD 39 (2)]. Do ustalenia różnicy związanej z płcią może być konieczne wykorzystanie trzech osobników każdej płci. Zwierzęta te należy poddać narażeniu przez jeden okres, zazwyczaj 240 min. Należy ocenić możliwość wytworzenia odpowiednich atmosfer doświadczalnych podczas wstępnych badań technicznych przeprowadzanych bez udziału zwierząt. Zazwyczaj nie ma potrzeby przeprowadzania badania rozpoznawczego, jeśli dostępne są dane dotyczące śmiertelności z badań przeprowadzonych metodą B.52 (4). Przy doborze początkowych stężeń docelowych w badaniu metodą B.2 kierownik badania powinien uwzględnić wzorce śmiertelności zaobserwowane we wszelkich dostępnych badaniach przeprowadzonych metodą B.52 (4) dla obu płci i wszystkich przebadanych stężeń [zob. GD 39 (2)].

Stężenie początkowe: protokół C × t

36. Stężenie początkowe (sesja narażenia I) (dodatek 1) to stężenie graniczne albo stężenie dobrane przez kierownika badania na podstawie badania rozpoznawczego. Na działanie tego stężenia wystawiane są grupy po jednym osobniku każdej płci przez wiele okresów trwania (np. po 15, 30, 60, 120 lub 240 minut), łącznie 10 zwierząt (tak zwana sesja narażenia I) (dodatek 1).

37. Dobór stężeń granicznych zazwyczaj zależy od wymogów regulacyjnych. Jeśli stosowane jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008, stężenia graniczne dla gazów, par i aerozoli wynoszą odpowiednio 20 000 ppm, 20 mg/l i 5 mg/l (lub maksymalne stężenie możliwe do uzyskania) (3). W przypadku niektórych badanych substancji chemicznych wytworzenie stężeń granicznych może być trudne technicznie, w szczególności dla substancji występujących w postaci par i aerozoli. Przy badaniu aerozoli celem powinno być uzyskanie cząstek o rozmiarze takim, aby mogły ulec wdychaniu (tzn. o MMAD od 1 do 4 μm) przy stężeniu granicznym równym 2 mg/l. Jest to możliwe dla większości badanych substancji chemicznych. Próby badania aerozoli przy stężeniu większym niż 2 mg/l należy przeprowadzać tylko w przypadku, gdy możliwe jest uzyskanie cząstek o rozmiarze takim, aby mogły ulec wdychaniu [zob. GD 39 (2)]. W rozporządzeniu (WE) nr 1272/2008 nie zaleca się badań z użyciem stężeń większych od stężenia granicznego ze względu na dobrostan zwierząt (3). Badanie stężeń większych od stężenia granicznego należy brać pod uwagę tylko w przypadku znacznego prawdopodobieństwa, że wyniki takich badań przyniosą bezpośrednie korzyści dla ochrony zdrowia ludzi (3), a w sprawozdaniu z badania należy podać uzasadnienie. W przypadku badanych substancji chemicznych, które są potencjalnie wybuchowe, należy dołożyć starań w celu uniknięcia warunków sprzyjających wybuchowi. Aby uniknąć zbędnego wykorzystywania zwierząt, należy przed badaniem z użyciem stężenia początkowego przeprowadzić test próbny bez udziału zwierząt w celu upewnienia się, że warunki w komorze do przeprowadzenia badania przy tym stężeniu są możliwe do osiągnięcia.

38. Jeżeli przy stężeniu początkowym obserwowana jest śmiertelność lub stany agonalne, wyniki badań przy tym stężeniu mogą pełnić rolę punktu początkowego dla dalszych badań przy innych stężeniach (zob. badanie główne). Jeżeli właściwości fizyczne lub chemiczne badanej substancji chemicznej uniemożliwiają osiągnięcie stężenia granicznego, należy przeprowadzić badanie przy maksymalnym osiągalnym stężeniu. Jeżeli przy maksymalnym osiągalnym stężeniu występuje śmiertelność mniejsza niż 50 %, dalsze badania nie są konieczne. Jeżeli uzyskanie stężenia granicznego było niemożliwe, w sprawozdaniu z badania należy to wyjaśnić i na dowód podać odpowiednie dane. Jeżeli maksymalne możliwe do uzyskania stężenie pary nie wywołuje toksyczności, może być konieczne podanie badanej substancji chemicznej jako aerozolu ciekłego.

▼M4

Badanie główne: protokół C × t

39. Stężenie początkowe (sesja narażenia I) (dodatek 1) w badaniu głównym to stężenie graniczne albo stężenie dobrane przez kierownika badania na podstawie badania rozpoznawczego. Jeżeli podczas sesji narażenia I lub po niej wystąpi śmiertelność, stężenia i okresy narażenia dla sesji narażenia II należy dobrać na podstawie minimalnego narażenia (C × t), które prowadzi do zgonu. Każda kolejna sesja narażenia zależy od sesji poprzedniej (zob. dodatek 1).

40. Dla wielu badanych substancji chemicznych wyniki otrzymane przy stężeniu początkowym wraz z trzema dodatkowymi sesjami narażenia charakteryzującymi się drobniejszą siatką czasową (daną szeregiem geometrycznym okresów narażenia określonym współczynnikiem pomiędzy kolejnymi okresami, zazwyczaj √2) będą wystarczające do ustalenia zależności śmiertelności C × t (15), ale zastosowanie narażenia przy piątej wartości stężenia może również przynieść pewne korzyści [zob. dodatek 1 oraz GD 39 (2)]. Sposób matematycznego opracowania wyników zastosowania protokołu C × t podano w dodatku 1.

OBSERWACJE

41. Zwierzęta w trakcie okresu narażenia należy często poddawać obserwacji klinicznej. Po narażeniu należy prowadzić obserwacje kliniczne – w dniu narażenia co najmniej dwukrotnie, lub częściej, jeśli wskazuje na to reakcja zwierząt na poddawanie działaniu substancji, a po tym dniu co najmniej raz dziennie przez łącznie 14 dni. Długość okresu obserwacji nie jest określona, należy ją jednak ustalić na podstawie charakteru i czasu wystąpienia objawów klinicznych oraz długości okresu zdrowienia. Czas, w jakim pojawiają się i zanikają oznaki toksyczności, jest istotny, szczególnie w przypadku tendencji do występowania opóźnionych oznak toksyczności. Wszystkie obserwacje są systematycznie zapisywane w ewidencji prowadzonej osobno dla każdego zwierzęcia. Zwierzęta, u których stwierdzono stan agonalny, oraz zwierzęta wykazujące objawy silnego bólu lub stresu należy ze względu na ich dobrostan uśmiercić w sposób humanitarny. Przy badaniu pod kątem klinicznych oznak toksyczności należy zachować ostrożność, aby nie pomylić początkowego złego wyglądu i przejściowych zmian oddechowych, będących skutkiem procedury narażenia, z toksycznością związaną z badaną substancją chemiczną, która wymagałaby wcześniejszego uśmiercenia zwierząt. Należy przestrzegać zasad i kryteriów streszczonych w wytycznych dotyczących humanitarnego punktu końcowego (GD 19) (7). W przypadku uśmiercenia zwierząt z przyczyn humanitarnych lub stwierdzenia ich zgonu należy możliwie najdokładniej zapisać czas zgonu.

42. Obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować zmiany skóry i sierści, oczu i błon śluzowych; jak również zmiany w układzie oddechowym i układzie krążenia, zmiany w autonomicznym i ośrodkowym układzie nerwowym oraz zmiany w aktywności somatycznej i sposobie zachowania. O ile to możliwe, należy odnotować rozróżnienie pomiędzy skutkami miejscowymi i ogólnoustrojowymi. Szczególną uwagę należy poświęcić obserwacjom drżenia, konwulsji, ślinotoku, biegunki, letargu, snu i śpiączki. Pomiar temperatury w odbycie może dostarczyć dodatkowych dowodów potwierdzających odruchowe spowolnienie oddechu lub hipo-/hipertermię w związku z poddawaniem działaniu substancji lub przetrzymywaniem w zamknięciu.

Masa ciała

43. Należy odnotowywać masę ciała poszczególnych zwierząt: raz podczas okresu aklimatyzacji, w dniu narażenia przed narażeniem (dzień 0), oraz przynajmniej w dniach 1, 3 i 7 (a następnie co tydzień), jak również w momencie zgonu lub eutanazji, jeśli śmierć nastąpi później niż w dniu 1. Masę ciała uznaje się za krytyczny wskaźnik toksyczności, zatem zwierzęta wykazujące stały spadek wagi na poziomie ≥ 20 % w porównaniu z wartościami przed badaniem należy ściśle monitorować. Po zakończeniu okresu po narażeniu zwierzęta, które przeżyły, są ważone i humanitarnie uśmiercane.

▼M4

Patologia

44. Wszystkie badane zwierzęta, włączając te, które padły podczas badań lub zostały poddane eutanazji i wyeliminowane z badań ze względu na ich dobrostan, należy poddać pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu. Jeżeli sekcji zwłok nie można przeprowadzić natychmiast po znalezieniu martwego zwierzęcia, zwierzę należy schłodzić (nie zamrozić) do temperatury wystarczająco niskiej do zminimalizowania autolizy. Sekcję zwłok należy przeprowadzić możliwie szybko, zwykle w ciągu jednego lub dwóch dni. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy odnotować wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne ze szczególnym uwzględnieniem wszelkich zmian w drogach oddechowych.

45. Można rozważyć przeprowadzenie dodatkowych, uprzednio zaprojektowanych testów w celu zwiększenia wartości interpretacyjnej badania, np. pomiaru masy płuc u szczurów, które przeżyły, czy dostarczenia dowodów na podrażnienie poprzez badanie dróg oddechowych pod mikroskopem. Można również objąć badaniem organy wykazujące wyraźne zmiany patologiczne u zwierząt, które przeżyły 24 lub więcej godzin, oraz organy, co do których wiadomo lub można oczekiwać, że narażenie miało na nie wpływ. Z badania mikroskopowego całego układu oddechowego można uzyskać użyteczne informacje na temat badanych substancji chemicznych, które reagują z wodą, takich jak kwasy i badane substancje chemiczne o właściwościach higroskopijnych.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

46. Należy podać dane dotyczące masy ciała i wyników sekcji zwłok dotyczące poszczególnych zwierząt. Dane z obserwacji klinicznych należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę wykorzystanych zwierząt, liczbę zwierząt wykazujących specyficzne oznaki toksyczności, liczbę zwierząt padłych w trakcie trwania badania lub uśmierconych z przyczyn humanitarnych, czas zgonu poszczególnych zwierząt, opis skutków toksycznych oraz ich przebieg w czasie i odwracalność, a także wyniki sekcji zwłok.

Sprawozdanie z badania

47. Sprawozdanie z badania powinno w stosownych przypadkach zawierać następujące informacje:

Badane zwierzęta i ich hodowla

— opis warunków przetrzymywania w klatkach, w tym: liczba (lub zmiana liczby) zwierząt na klatkę, ściółka, temperatura otoczenia i wilgotność względna, fotoperiod i określenie diety,

— wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie zastosowania gatunków innych niż szczur,

— liczba, wiek i płeć zwierząt,

— metoda randomizacji,

— szczegółowe informacje na temat jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety oraz źródło wody),

— opis wszelkich przygotowań przed badaniem, w tym diety, kwarantanny i leczenia chorób,

▼M4

Badana substancja chemiczna

— cechy fizyczne, czystość oraz w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (w tym izomeryzacja),

— dane identyfikacyjne i numer w rejestrze Chemical Abstract Services (CAS), jeżeli jest znany,

Nośnik

— uzasadnienie zastosowania nośnika oraz uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda),

— dane historyczne lub uzyskane równolegle wykazujące, że nośnik nie zakłóca wyniku badania,

Komora inhalacyjna

— szczegółowy opis komory inhalacyjnej, w tym jej rozmiary i objętość,

— źródło i opis wyposażenia wykorzystywanego do celów narażenia zwierząt, jak również do wytwarzania atmosfery,

— wyposażenie do pomiaru temperatury, wilgotności, rozmiaru cząstek i stężenia rzeczywistego,

— źródło powietrza, metoda oczyszczania dostarczanego/pobieranego powietrza oraz system klimatyzacji,

— metody kalibracji wyposażenia w celu zapewnienia jednorodnej atmosfery na potrzeby badania,

— różnica ciśnienia (dodatnia lub ujemna),

— porty narażenia w komorze (narażenie tylko przez nos); lokalizacja zwierząt w układzie (narażenie całego ciała),

— jednorodność/stabilność w czasie atmosfery na potrzeby badania,

— lokalizacja czujników temperatury i wilgotności oraz pobieranie próbek powietrza w komorze,

— natężenie przepływu powietrza, natężenie przepływu powietrza/port narażenia (narażenie tylko przez nos) lub ładunek zwierząt/komorę (narażenie całego ciała),

— informacje na temat wyposażenia stosowanego do pomiaru zawartości tlenu i dwutlenku węgla, w stosownych przypadkach,

— czas potrzebny na wyrównanie stężeń w komorze inhalacyjnej (t_{95}),

— liczba zmian objętości na godzinę,

— urządzenia pomiarowe (w stosownych przypadkach),

Dane dotyczące narażenia

— uzasadnienie wyboru docelowego stężenia w badaniu głównym,

— stężenia nominalne (całkowita masa badanej substancji chemicznej wprowadzonej do komory inhalacyjnej podzielona przez objętość powietrza przepuszczonego przez komorę),

— rzeczywiste stężenia badanej substancji chemicznej w próbkach ze strefy oddychania zwierząt; w przypadku mieszanin, które tworzą heterogeniczne formy fizyczne (gazy, pary, aerozole), każdą substancję można analizować oddzielnie,

▼M4

— wszystkie stężenia substancji w powietrzu należy podawać w jednostkach masy (np. mg/l, mg/m^3 itd.); w nawiasie można podać również jednostki objętości (np. ppm, ppb itd.),

— rozkład wielkości cząstek, średnica aerodynamiczna mediany rozkładu masowego (MMAD) oraz geometryczne odchylenie standardowe (σg), w tym metody ich obliczania. Należy odnotować poszczególne analizy wielkości cząstek,

Warunki badania

— szczegółowe informacje na temat przygotowania badanej substancji chemicznej, w tym szczegóły dotyczące wszelkich procedur zastosowanych w celu zmniejszenia rozmiaru cząstek ciał stałych lub przygotowania roztworów badanej substancji chemicznej. W przypadkach, gdy procesy mechaniczne mogły wpłynąć na zmianę składu badanej substancji chemicznej, należy zamieścić wyniki analiz mających na celu weryfikację składu badanej substancji chemicznej,

— opis (najlepiej wraz ze schematem) wyposażenia wykorzystywanego do wytworzenia atmosfery na potrzeby badania i narażania zwierząt na jej działanie,

— szczegółowe informacje na temat zastosowanej metody analizy chemicznej oraz walidacji metody (w tym wydajność odzysku badanej substancji chemicznej ze środka do pobierania próbek),

— uzasadnienie wyboru badanych stężeń,

Wyniki

— tabelaryczne zestawienie temperatury, wilgotności i przepływu powietrza w komorze,

— tabelaryczne zestawienie danych dotyczących nominalnego i rzeczywistego stężenia w komorze,

— tabelaryczne zestawienie danych dotyczących rozmiaru cząstek, w tym danych dotyczących gromadzenia próbek analitycznych, rozkładu wielkości cząstek oraz obliczenia MMAD i σ_g,

— tabelaryczne zestawienie danych dotyczących reakcji i poziomu stężenia dla każdego zwierzęcia (tj. zwierząt wykazujących oznaki toksyczności, w tym śmiertelność, rodzaj, ostrość, czas pojawienia się i czas trwania objawów),

— masy ciała poszczególnych zwierząt zarejestrowane w trakcie badania, data i godzina zgonu, jeśli nastąpił przed planową eutanazją, przebieg w czasie oznak toksyczności i informacje, czy były one odwracalne w przypadku każdego zwierzęcia,

— wyniki sekcji zwłok oraz badań histopatologicznych w odniesieniu do każdego zwierzęcia, jeżeli są dostępne,

— oszacowania dotyczące śmiertelności (np. LC_{50}, LD_{01}), w tym granice przedziału ufności 95 % i nachylenie (jeżeli w wyniku zastosowania danej metody oceny je uzyskano),

— relacja statystyczna, w tym oszacowanie wykładnika n (protokół C × t). Należy podać nazwę zastosowanego oprogramowania do obliczeń statystycznych,

▼M4

Omówienie i interpretacja wyników

— szczególny nacisk należy położyć na opis metod zastosowanych w celu spełnienia kryteriów niniejszej metody badawczej, np. dotyczących stężenia granicznego lub rozmiaru cząstek,

— należy uwzględnić respirabilność cząstek w świetle wyników ogólnych, szczególnie jeżeli nie można było spełnić kryterium rozmiaru cząstek,

— należy przedstawić wyjaśnienie, jeżeli zaistniała konieczność humanitarnego uśmiercenia zwierząt wykazujących oznaki bólu lub objawy ostrego i przewlekłego stresu, zgodnie z kryteriami zawartymi w wytycznych OECD dotyczących humanitarnego punktu końcowego (8),

— jeżeli przerwano badania metodą opisaną w rozdziale B.52 niniejszego załącznika (4) na rzecz niniejszej metody badawczej B.2, należy podać uzasadnienie,

— w ogólnej ocenie badania należy uwzględnić spójność metod zastosowanych w celu określenia nominalnego i rzeczywistego stężenia oraz relacji między stężeniem rzeczywistym a nominalnym,

— należy uwzględnić prawdopodobną przyczynę zgonu i dominujący sposób działania (ogólnoustrojowy w porównaniu z miejscowym).

BIBLIOGRAFIA:

(1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paryż. Dokument dostępny pod adresem: [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 nr 39, OECD, Paryż. Dokument dostępny pod adresem: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(3) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1).

(4) Rozdział B.52 niniejszego załącznika, Ostra toksyczność inhalacyjna – Metoda klas ostrej toksyczności.

(5) Rozdział B.40 niniejszego załącznika – Badanie niszczenia skóry metodą in vitro: test przezskórnego oporu elektrycznego (TER).

(6) Rozdział B.40bis niniejszego załącznika – Badanie zniszczenia skóry metodą in vitro: badanie modelu skóry ludzkiej.

(7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paryż. Dokument dostępny pod adresem: [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 nr 19, OECD, Paryż. Dokument dostępny pod adresem: [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. (wyd. 2) Informa Healthcare, Nowy Jork.

▼**M4**

(11) Pauluhn J i Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

(12) Zwart JHE, Art.s 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, Art.s 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 i 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 x t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment nr 104, OECD, Paryż. Dokument dostępny pod adresem: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, wyd. 3. Cambridge University Press, Londyn/Nowy Jork.

DEFINICJA

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M4

Dodatek 1

Protokół C × t

1. Alternatywą do protokołu tradycyjnego przy ocenie toksyczności inhalacyjnej może być wykonywane w procedurze sekwencyjnej badanie „stężenie × czas” (C × t) (12) (13) (14). Protokół ten najlepiej jest stosować wtedy, gdy istnieje szczególna, wynikająca z regulacji lub powodów naukowych potrzeba przeprowadzenia badań na zwierzętach przy zastosowaniu wielu okresów trwania narażenia, np. do celów planowania działań w sytuacjach wyjątkowych czy też gospodarowania gruntami. Badania w ramach tego podejścia zaczyna się zazwyczaj od stężenia granicznego (sesja narażenia I), przy którym zwierzęta poddawane są działaniu badanej substancji chemicznej przez pięć okresów trwania (np. 15, 30, 60, 120 i 240 minut), tak aby w jednej sesji narażenia otrzymać wiele okresów narażenia (zob. rysunek 1). Jeśli stosowane jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008, stężenia graniczne dla gazów, par i aerozoli wynoszą odpowiednio 20 000 ppm, 20 mg/l i 5 mg/l. Poziomy te można przekroczyć tylko wtedy, jeżeli istnieje wynikająca z regulacji lub powodów naukowych potrzeba przeprowadzenia badań przy tych stężeniach (zob. pkt 37 w tekście głównym dotyczącym metody B.2).

2. W sytuacji niewystarczającej ilości lub braku informacji na temat toksyczności badanej substancji chemicznej należy przeprowadzić badanie rozpoznawcze, w którym grupy składające się z nie więcej niż 3 zwierząt każdej płci poddawane są działaniu dobranych przez kierownika badania stężeń docelowych, zazwyczaj przez 240 min.

3. Jeżeli podczas sesji narażenia I zbadane zostało stężenie graniczne i wystąpiła śmiertelność mniejsza niż 50 %, nie ma potrzeby przeprowadzania dodatkowych badań. Jeżeli istnieje wynikająca z regulacji lub powodów naukowych potrzeba ustalenia relacji stężenie/czas/reakcja przy poziomach wyższych niż wskazane stężenie graniczne, należy przeprowadzić kolejne narażenie na działanie wyższego stężenia, np. dwukrotnego stężenia granicznego (tzn. 2L na rysunku 1).

4. Jeżeli przy stężeniu granicznym obserwowana jest toksyczność, konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych badań (badania głównego). Dodatkowe sesje narażenia przeprowadza się albo przy niższych stężeniach (sesje narażenia II, III lub IV’ na rysunku 1), albo przy wyższych stężeniach przez krótszy czas (sesja narażenia IV na rysunku 1) przy zastosowaniu odpowiednio dostosowanych okresów trwania narażenia i krótszego czasu między nimi.

5. Badanie (dla stężenia wstępnego i stężeń dodatkowych) przeprowadza się przy wykorzystaniu 1 zwierzęcia każdej płci na stężenie/czas lub 2 zwierząt płci bardziej podatnej na stężenie/czas. W pewnych okolicznościach kierownik badania może zdecydować o wykorzystaniu 2 szczurów każdej płci na stężenie/czas (lub 4 zwierząt płci bardziej podatnej na stężenie/czas) (15). Dzięki wykorzystaniu dwóch osobników każdej płci na stężenie/czas zazwyczaj zmniejsza się błędy systematyczne i zmienność szacunków, zwiększa dokładność szacunków i poprawia przedział ufności dotyczący opisanego tu protokołu. Dalsze szczegóły podano w GD 39 (2).

6. W idealnym przypadku każda sesja narażenia realizowana jest jednego dnia. Umożliwia to opóźnienie kolejnego narażenia do momentu, gdy będzie można w uzasadniony sposób założyć, że zwierzęta przeżyły, i pozwala kierownikowi badania na dostosowanie docelowych stężeń i czasów trwania przy następnej sesji narażenia. Zaleca się rozpoczęcie każdej sesji narażenia od grupy, która będzie poddawana narażeniu najdłużej, tzn. od grupy poddawanej 240-minutowemu narażeniu, następnie badać grupę poddawaną narażeniu przez 120 minut i tak dalej. Przykładowo, jeśli zwierzęta w grupie 240-minutowej po 90 minutach zdychają lub wykazują poważne oznaki toksyczności (np. ekstremalne zmiany w sposobie oddychania, takie jak trudności z oddychaniem), narażanie grupy przez 120 minut nie ma sensu, ponieważ śmiertelność najprawdopodobniej wyniesie 100 %. Dla tego stężenia kierownik badania powinien zatem wybrać krótsze okresy narażenia (np. 90, 65, 45, 33 i 25 minut).

▼M4

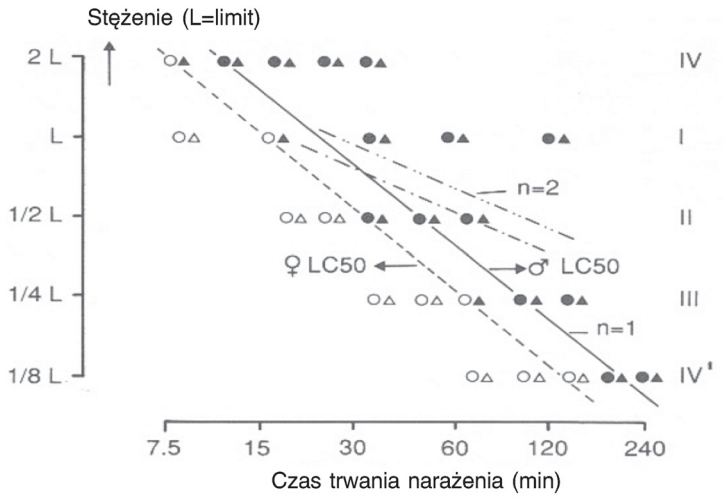
7. Stężenie w komorze należy często mierzyć w celu wyznaczenia ważonej czasowo średniej stężenia na każdy czas trwania narażenia. Tam, gdzie to możliwe, w analizie statystycznej należy użyć czasu zgonu każdego zwierzęcia (a nie czasu trwania narażenia).

8. Wyniki pierwszych czterech sesji narażenia należy przeanalizować w celu znalezienia luki w danych dla krzywej stężenie-czas (zob. rysunek 1). W przypadku gdy dopasowanie jest niewystarczające, można przeprowadzić dodatkowe narażenie (przy piątej wartości stężenia). Stężenie i czas trwania narażenia dla piątej sesji należy dobrać tak, by wypełnić tę lukę w danych.

9. Do obliczenia relacji stężenie-czas-reakcja za pomocą analizy statystycznej (16) wykorzystuje się wszystkie sesje narażenia (w tym pierwszą). O ile to możliwe, dla każdego interwału C × t należy użyć ważonej czasowo średniej stężenia i czasu trwania narażenia aż do zgonu (jeśli zgon nastąpi podczas narażenia).

Rysunek 1

Hipotetyczna ilustracja relacji stężenie-czas-śmiertelność u szczurów



Symbole bez wypełnienia = zwierzęta, które przeżyły; symbole pełne = zwierzęta padłe

Trójkąty = samice; kółka = samce

Linia ciągła = wartości LC_{50} (zakres 7,5–240 min) dla samców przy n = 1

Linia przerywana = wartości LC_{50} (zakres 7,5–240 min) dla samic przy n = 1

Linie kropkowane = linie hipotetycznych wartości LC_{50} dla samców i samic, gdyby wartość n wynosiła 2 (12).

Glosariusz

Stężenie:

Czas trwania narażenia:

▼M4

10. Poniżej podano przykład procedury sekwencyjnej:

Sesja narażenia I – Badanie przy stężeniu granicznym (zob. rysunek 1)

— 1 zwierzę/płeć dla relacji stężenie/czas; łącznie 10 zwierząt ([a]).

— Stężenie docelowe ([b]) = stężenie graniczne.

— Pięć grup zwierząt poddaje się narażeniu przy tym stężeniu docelowym przez okresy odpowiednio 15, 30, 60, 120 i 240 minut.

↓

Sesja narażenia II ([c]) – Badanie główne

— 1 zwierzę/płeć na stężenie/czas; łącznie 10 zwierząt.

— Pięć grup zwierząt poddaje się narażeniu przy niższym stężeniu ([d]) (1/2L) przez nieco dłuższe okresy (przeskalowane współczynnikiem √2, zob. rysunek 1).

↓

Sesja narażenia III – Badanie główne

— 1 zwierzę/płeć na stężenie/czas; łącznie 10 zwierząt.

— Pięć grup zwierząt poddaje się narażeniu przy niższym stężeniu ([d]) (1/4L) przez nieco dłuższe okresy (przeskalowane współczynnikiem √2, zob. rysunek 1).

↓

Sesja narażenia IV' – Badanie główne

— 1 zwierzę/płeć na stężenie/czas; łącznie 10 zwierząt.

— Pięć grup zwierząt poddaje się narażeniu przy niższym stężeniu ([d]) (1/8L) przez nieco dłuższe okresy (przeskalowane współczynnikiem √2, zob. rysunek 1).

↓ albo

([a]) W razie braku dostępnych informacji na temat podatności związanej z płcią wykorzystuje się szczury obu płci, tzn. 1 zwierzę/płeć na każde stężenie. Na podstawie istniejących informacji bądź gdy podczas tej sesji narażenia stanie się oczywiste, że jedna z płci jest bardziej podatna, podczas kolejnych badań wykorzystuje się 10 zwierząt podatnej płci (2 osobniki na stężenie/czas) przy każdym poziomie stężenia.

([b]) Jeśli stosowane jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008, stężenia graniczne dla gazów, par i aerozoli wynoszą odpowiednio 20 000 ppm, 20 mg/l i 5 mg/l. W przypadku oczekiwanej toksyczności lub na podstawie wyników badania rozpoznawczego należy wybrać niższe stężenia początkowe. Jeżeli jest taka potrzeba, wynikająca z regulacji lub powodów naukowych, można zastosować wyższe stężenia.

([c]) Najlepiej odwlec narażenie zwierząt przy kolejnym stężeniu do momentu, gdy można rozsądnie uznać, że zwierzęta poddane poprzednio narażeniu przeżyły. Dzięki temu kierownik badania może dopasować stężenie docelowe i czas trwania dla kolejnej sesji narażenia.

([d]) Kolejną kombinację stężenia i czasu trwania narażenia ustala się, biorąc jako wytyczną minimalną dawkę (stężenie × czas), która spowodowała śmiertelność podczas badania przy stężeniu początkowym (pierwsza sesja narażenia). Zazwyczaj stężenie zmniejsza się dwukrotnie (1/2L) i zwierzęta poddawane są narażeniu w nowym zakresie czasowym charakteryzującym się krótszymi odstępami między sesjami narażenia, wyznaczonymi przy zastosowaniu dzielenia geometrycznego okresów narażenia przez współczynnik 1,4 (√2, zob. pozycja literaturowa 11), zaczynając od czasu trwania odpowiadającego poziomowi minimalnej dawki śmiertelnej (czas × stężenie) zaobserwowanemu podczas pierwszego narażenia. W zilustrowanym przypadku (rysunek 1) zaobserwowano śmiertelność w sesji narażenia I po 15 minutach; czasy trwania narażenia podczas sesji II są zatem dobrane w odniesieniu do środkowego punktu 30 minut i są równe 15, 21, 30, 42 i 60 minut. Po pierwszych dwóch sesjach narażenia zdecydowanie zaleca się przedstawienie danych w formie wykresu podobnego do powyższego i sprawdzenie, czy linia obrazująca relację między stężeniem i czasem tworzy kąt 45 stopni (n = 1), ma nachylenie mniejsze (np. n = 2), czy też większe (np. n = 0,8). W tym ostatnim przypadku zdecydowanie zaleca się stosowne dostosowanie kolejnych stężeń i czasów trwania.

▼M4

Sesja narażenia IV – badanie główne

— 1 zwierzę/płeć na stężenie/czas; łącznie 10 zwierząt.

— Pięć grup zwierząt poddaje się narażeniu przy wyższym stężeniu ([e]) (2L) przez nieco krótsze okresy (przeskalowane współczynnikiem √2, zob. rysunek 1).

Opracowanie matematyczne wyników zastosowania protokołu C × t

11. W procedurze C × t obejmującej 4 lub 5 stężeń substancji i pięć czasów trwania narażenia uzyskuje się odpowiednio 20 lub 25 punktów pomiarowych. Na ich podstawie można obliczyć relację C × t za pomocą analizy statystycznej (16):

Równanie 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

gdzie: C = stężenie; t = czas trwania narażenia, lub

Równanie 2:

$$Reakcja = f(C^n t)$$

gdzie: $n = b_1/b_2$.

Za pomocą równania 1 można obliczyć wartość LC_{50} dla danego czasu trwania (np. 4 godziny, 1 godzina, 30 minut, lub dowolnego czasu trwania w badanym zakresie), podstawiając P = 5 (reakcja 50 %). Należy zauważyć, że reguła Habera ma zastosowanie tylko dla n = 1. LC_{01} można obliczyć podstawiając P = 2,67.

([e]) W niektórych przypadkach może być konieczne zwiększenie stężenia (2L) w nowym zakresie czasowym charakteryzującym się jeszcze krótszymi odstępami czasowymi, wyznaczonymi przy zastosowaniu dzielenia geometrycznego okresów narażenia przez współczynnik 1,4 (√2), zaczynając od czasu trwania odpowiadającego poziomowi minimalnej dawki śmiertelnej zaobserwowanemu podczas pierwszego narażenia. Minimalny czas trwania narażenia powinien być dłuższy niż 5 minut, maksymalny zaś nie przekraczać 8 godzin.

▼B

B.3. **TOKSYCZNOŚĆ OSTRA (DERMALNA)**

1. **METODA**

1.1. WPROWADZENIE

Zob. Wprowadzenie ogólne część B lit. A).

1.2. DEFINICJA

Zob. Wprowadzenie ogólne część B lit. B).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Substancję badaną nakłada się na skórę w stopniowanych dawkach kilku grupom zwierząt doświadczalnych, po jednej dawce na grupę. Następnie obserwuje się skutki podania substancji i zgony. Zwierzęta, które zdechną w trakcie badania, i te, które przeżyją po jego zakończeniu, poddaje się sekcji zwłok.

Zwierzęta wykazujące ciężkie i trwałe oznaki stanu zagrożenia i bólu mogą wymagać humanitarnego uśmiercenia. Dozowanie badanych substancji na drodze znanej z powodowania znaczącego bólu i stany zagrożenia z powodu właściwości żrących lub drażniących nie może być przeprowadzane.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA

1.6.1. **Przygotowania**

Zwierzęta muszą być trzymane w doświadczalnych warunkach pobytu i karmienia przez co najmniej pięć dni przed przeprowadzeniem badania. Przed przeprowadzeniem badania zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta są wybierane losowo i przydzielane do poszczególnych grup otrzymujących substancję. Na około 24 godziny przed przeprowadzeniem badania należy usunąć sierść z grzbietowej powierzchni tułowia zwierząt przez przycięcie lub ogolenie. Podczas przycinania lub golenia sierści należy uważać, aby nie uszkodzić skóry, gdyż mogłoby to zmienić jej przepuszczalność. Nie mniej niż 10 % powierzchni ciała powinno być wolne do zastosowania substancji badanej. W przypadku badania ciał stałych, które powinny zostać sproszkowane, o ile jest to właściwe, substancja badana powinna zostać wystarczająco zwilżona wodą lub w razie konieczności odpowiednim podłożem zapewniającym dobry kontakt ze skórą. W przypadku wykorzystania podłoża należy uwzględnić jego wpływ na penetrację substancji badanej przez skórę. Płynne substancje badane stosuje się na ogół w stanie nierozcieńczonym.

1.6.2. **Warunki badania**

1.6.2.1. *Zwierzęta doświadczalne*

Można wykorzystać dorosłe szczury lub króliki. Można również wykorzystać inne gatunki, jednak wymaga to uzasadnienia. Należy wykorzystywać powszechnie stosowane szczepy laboratoryjne. Dla każdej płci na początku badania zakres zmienności wagowej użytych zwierząt nie powinien przekraczać ± 20 % właściwej wartości średniej.

▼B

1.6.2.2. *Liczba i płeć*

Co najmniej pięć zwierząt jest używanych dla każdej wielkości dawki. Powinny być one wszystkie jednakowej płci. Jeżeli stosuje się samice, powinny być one nieródkami i nie mogą być w ciąży. Jeżeli dostępna jest informacja wskazująca, że dana płeć jest znacząco bardziej czuła, należy użyć do dawkowania zwierząt tej płci.

Uwaga: W badaniach ostrej toksyczności u zwierząt wyższego rzędu niż gryzonie należy rozważyć użycie mniejszej ilości. Dawki muszą być starannie wybrane oraz należy dołożyć wszelkich starań by nie przekraczać dawek średniej toksyczności. Należy unikać podawania w takich badaniach dawek śmiertelnych substancji badanej.

1.6.2.3. *Poziomy dawkowania*

Powinno się zapewnić odpowiednią liczbę, co najmniej trzy, przy czym należy zachować odpowiednie odstępy między nimi, tak aby uzyskać grupy badane różniące się istotnie efektami toksycznymi i umieralnością. Przy podejmowaniu decyzji co do wielkości dawek należy uwzględniać wszelkie działania drażniące i żrące. Dane powinny być wystarczające do opracowania krzywej zależności odpowiedzi od dawki oraz, o ile to będzie możliwe, do ustalenia w możliwy do przyjęcia sposób wartości LD_{50}.

1.6.2.4. *Badanie graniczne*

Przeprowadza się badanie graniczne przy jednej wielkości dawki, przynajmniej 2 000 mg/kg masy ciała, w grupie składającej się z pięciu samców i pięciu samic, stosując procedurę powyżej opisaną. Jeżeli zachodzi związek śmiertelności z badaną substancją, należy rozważyć wykonanie pełnego badania.

1.6.2.5. *Okres obserwacji*

Okres obserwacji powinien wynosić co najmniej 14 dni. Jednakże nie powinien on być sztywno ustalony. Powinien zależeć od reakcji toksycznych, szybkości ich pojawiania się oraz okresu powrotu do zdrowia po ich wystąpieniu; w związku z tym można go wydłużyć, jeżeli uzna się to za konieczne. Ważny jest czas, po jakim pojawiają się i znikają objawy toksyczności, oraz czas zgonu, zwłaszcza gdy istnieje tendencja do opóźnionych zgonów.

1.6.3. **Procedura**

Zwierzęta powinny być trzymane w oddzielnych klatkach. Substancja badana powinna zostać nałożona w sposób równomierny na obszar równy około 10 % całkowitej powierzchni ciała. W przypadku substancji wysoce toksycznych można je nanieść na mniejszą powierzchnię, jednak należy dążyć do tego, aby pokryć jak największy obszar jak najcieńszą i jak najbardziej równomierną warstwą badanego związku.

Substancje badane powinny być utrzymywane w kontakcie ze skórą dzięki zastosowaniu porowatego opatrunku z gazy i niedrażniącej taśmy w trakcie ekspozycji zapewnianej przez 24 godziny. Miejsce badania należy dodatkowo przykryć w taki sposób, aby utrzymać opatrunek z gazy i substancję badaną i zapewnić, aby zwierzęta nie mogły zjeść tej ostatniej. W celu zapobieżenia spożyciu substancji badanej można uwiązać zwierzę, jednak pełna immobilizacja nie jest zalecaną metodą.

▼B

Pod koniec okresu ekspozycji należy usunąć resztki badanej substancji, w miarę możliwości stosując wodę lub jakieś inne, właściwe metody oczyszczania skóry.

Obserwacje należy odnotowywać w sposób systematyczny, w miarę ich zbierania. Należy prowadzić oddzielne zapisy dla każdego zwierzęcia. Obserwacja powinna być częsta w ciągu pierwszego dnia. Staranne badanie kliniczne należy przeprowadzać co najmniej raz każdego dnia roboczego. Inne obserwacje należy przeprowadzać codziennie, podejmując odpowiednie działania mające na celu zmniejszenie do minimum utraty zwierząt podczas badania, np. sekcję zwłok lub zamrażanie tych zwierząt, które zostaną znalezione martwe, oraz izolację lub usypianie zwierząt słabych lub śmiertelnie chorych.

Obserwacje przy klatce zwierzęcia powinny obejmować zmiany sierści, traktowanej substancją skóry, oczu i błon śluzowych oraz zmiany układu oddechowego, krążenia, autonomicznego i ośrodkowego układu nerwowego, jak też wzorców aktywności somatomotorycznej i wzorca zachowania. Szczególną uwagę należy zwrócić na obserwacje drżeń, drgawek, zwiększonego wydzielania śliny, biegunki, stanów zwiększonej senności, snu i śpiączki. Należy jak najprecyzyjniej odnotować termin zgonu. Zwierzęta, które zdechną w trakcie badania, i te, które przeżyją po jego zakończeniu, poddaje się sekcji zwłok. Należy odnotować wszelkie makroskopowe zmiany patologiczne. O ile jest to wskazane, należy pobrać wycinki tkanek do badania histopatologicznego.

Ocena toksyczności dla innej płci

Po zakończeniu badań jednej płci, przeprowadza się dawkowanie na przynajmniej jednej grupie pięciu zwierząt płci przeciwnej, w celu ustalenia czy zwierzęta tej płci nie są znacząco bardziej wrażliwe na substancję badaną. Użycie mniejszej ilości zwierząt musi być uzasadnione w indywidualnych okolicznościach. Jeżeli dostępna jest stosowna informacja pokazująca, że zwierzęta badanej płci są znacznie bardziej wrażliwe, drugą płeć można pominąć.

2. **DANE**

Dane należy przedstawić w skrócie w formie tabelarycznej, z podaniem – dla każdej badanej grupy – liczby zwierząt na początku badania, terminów zgonu poszczególnych zwierząt, liczby zwierząt wykazujących inne objawy toksyczności, opisu efektów toksycznych i wyniku sekcji zwłok. Należy określić masę ciała poszczególnych zwierząt i zapisać ją tuż przed podaniem badanej substancji, a później co tydzień i w momencie zgonu. Należy obliczać zmiany masy ciała i zapisywać je, gdy zwierzę przeżyje więcej niż jedną dobę. Zwierzęta humanitarnie zabite z powodu bólu i zagrożenia związanego z daną substancją są zapisywane jako uśmiercone w związku z substancją. Można ustalić LD_{50} przy użyciu uznanej metody.

Ocena danych powinna objąć istnienie ewentualnej współzależności pomiędzy ekspozycją zwierząt na substancję badaną a częstością i ciężkością wszelkich zaburzeń, włącznie z zaburzeniami zachowania i klinicznymi, zmianami makroskopowymi, zmianami masy ciała, umieralnością i wszelkimi innymi efektami toksycznymi.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

▼B

— gatunek, szczep, źródło, warunki środowiska, dieta itp.,

— warunki badania (włączając metodę oczyszczania skóry i typ opatrunku: okluzyjny lub nieokluzyjny),

— wielkości dawek (wraz z podłożem, o ile jest wykorzystane, i stężeniami),

— płeć zwierząt poddanych dawkowaniu,

— tabelaryczne przedstawienie danych reakcji toksycznej w rozbiciu na płcie i wielkość dawki (to jest liczba padłych zwierząt lub zabitych w czasie trwania badania, liczba zwierząt wykazujących oznaki działania toksycznego, liczba zwierząt poddanych ekspozycji),

— czas zgonu po dawkowaniu, przyczyny i kryteria przyjęte przy humanitarnym zabijaniu zwierząt,

— wszystkie obserwacje,

— wartość LD_{50} dla płci poddanej pełnym badaniom ustalonym na 14 dni (wraz z określoną metodą oznaczania),

— 95 % przedział ufności dla LD_{50} (o ile można go przedstawić),

— krzywa zależności umieralności od dawki i jej nachylenie (o ile metoda oznaczania pozwala na ustalenie tych danych),

— wyniki sekcji zwłok,

— wszelkie wyniki badań histopatologicznych,

— wyniki wszystkich badań płci przeciwnej,

— omówienie wyników (należy zwrócić szczególną uwagę, że humanitarne zabicie zwierząt w czasie trwania badania wpływa na obliczoną wartość LD_{50}),

— interpretacja wyników.

3.2. OCENA I INTERPRETACJA

Zob. Wprowadzenie ogólne część B lit. D).

4. **LITERATURA**

Zob. Wprowadzenie ogólne część B lit. E).

▼M8

B.4. **OSTRE DZIAŁANIE DRAŻNIĄCE/ŻRĄCE NA SKÓRĘ**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 404 (2015). Okresowo dokonuje się przeglądu wytycznych OECD dotyczących badania substancji chemicznych, aby odzwierciedlały one najlepszą dostępną wiedzę naukową. W przeglądzie dotyczącej badań wytycznej (TG) OECD nr 404 szczególną uwagę poświęcono ewentualnym ulepszeniom w zakresie dobrostanu zwierząt i oceny wszystkich dostępnych informacji na temat badanej substancji chemicznej w celu uniknięcia niepotrzebnych badań na zwierzętach laboratoryjnych. Zaktualizowana wersja dotyczącej badań wytycznej OECD nr 404 (pierwotnie przyjętej w 1981 r., poprawianej w latach 1992, 2002 i 2015) zawiera odniesienia do wytycznych dotyczących zintegrowanych podejść do badań i oceny (IATA) podrażnienia skóry / działania żrącego na skórę (1) sugerujących podejście modułowe do badań nad podrażnieniem i działaniem żrącym na skórę. W ramach IATA opisano kilka modułów grupujących źródła informacji i narzędzia do analizy danych oraz (i) przedstawiono wytyczne dotyczące sposobu włączania i wykorzystywania istniejących danych, które uzyskano w ramach badań i metodami niebadawczymi, do celów oceny potencjałów substancji chemicznych pod względem działania drażniącego i żrącego na skórę, a także (ii) zaproponowano podejście w sytuacji gdy potrzebne są dalsze badania (1). Ponadto w razie potrzeby, zamiast jednoczesnego zastosowania u zwierzęcia trzech płatków gazy we wstępnym badaniu *in vivo*, w powyższej wytycznej zalecane jest sekwencyjne zastosowanie płatków.

2. Definicje działania drażniącego i żrącego na skórę podano w dodatku do niniejszej metody badawczej.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

3. Z uwagi na dobrze pojęty interes nauki i dobrostan zwierząt nie należy przeprowadzać badań *in vivo*, dopóki wszystkie dostępne dane na temat potencjalnego żrącego/drażniącego działania badanej substancji chemicznej na skórę nie zostaną ocenione w ramach analizy wagi dowodów tak, jak to przedstawiono w wytycznej dotyczącej zintegrowanych podejść do badań i oceny działania żrącego i drażniącego na skórę, tj. w trzech częściach tej wytycznej i ich odpowiednich modułach (1). W części 1 omówiono pokrótce istniejące danych w siedmiu modułach obejmujących dane dotyczące ludzi, dane *in vivo*, dane *in vitro*, dane dotyczące właściwości fizykochemicznych (np. pH, w szczególności silnej kwasowości lub zasadowości) i metody niebadawcze. W części 2 przeprowadzono analizę wagi dowodów. Jeżeli powyższa analiza wagi dowodów okaże się niejednoznaczna, należy przeprowadzić dodatkowe badania, o których mowa w części 3, zaczynając od metod *in vitro*, przy czym badania *in vivo* stosuje się w ostateczności. Wspomniana analiza powinna zatem przyczynić się do ograniczenia potrzeby prowadzenia badań *in vivo* pod kątem działania żrącego/drażniącego na skórę wywołanego przez badane substancje chemiczne, w odniesieniu do których już istnieje wystarczający, pochodzący z innych badań materiał dowodowy dotyczący tych dwóch odnośnych punktów końcowych.

ZASADA BADANIA IN VIVO

4. Substancja chemiczna, która ma być zbadana, jest nakładana na skórę zwierzęcia doświadczalnego w pojedynczej dawce; część skóry niepoddana zabiegowi służy jako część kontrolna. Stopień działania żrącego/drażniącego jest określany i oceniany przy pomocy punktacji w określonych odstępach, a następnie dodatkowo opisywany w celu całkowitego oszacowania skutków działania. Czas trwania badania powinien być wystarczający do oceny odwracalności lub nieodwracalności zaobserwowanych skutków.

▼M8

5. Zwierzęta wykazujące ciągłe objawy silnego stresu lub bólu na jakimkolwiek etapie badania powinny zostać uśmiercone w sposób humanitarny, a badana substancja chemiczna oceniona stosownie do zaobserwowanych skutków. Kryteria podejmowania decyzji o uśmiercaniu zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących silny ból określono w osobnych wytycznych (2).

PRZYGOTOWANIA DO BADANIA IN VIVO

Wybór gatunku zwierząt

6. Preferowanym gatunkiem zwierzęcia laboratoryjnego jest królik albinos; wykorzystywane są zdrowe młode dorosłe króliki. W przypadku wykorzystania innych gatunków należy podać uzasadnienie.

Przygotowanie zwierząt

7. Na około 24 godziny przed przeprowadzeniem badania należy krótko przyciąć sierść z powierzchni grzbietowej tułowia zwierząt. Należy unikać otarć skóry; należy wykorzystywać wyłącznie zwierzęta ze zdrową nienaruszoną skórą.

8. Niektóre szczepy królików mają kępy futra, których gęstość jest większa w określonych porach roku. Takie obszary gęstego futra nie powinny być używane jako miejsca badań.

Warunki utrzymywania i karmienia

9. Zwierzęta należy trzymać oddzielnie. W przypadku królików temperatura w pomieszczeniach dla zwierząt doświadczalnych powinna wynosić 20 °C (± 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne w cyklu 12 godzin z dostępem światła i 12 godzin bez dostępu światła. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej.

PROCEDURA BADANIA

Podawanie badanej substancji chemicznej

10. Badana substancja chemiczna powinna zostać zaaplikowana na małym obszarze skóry (około 6 cm^2) i przykryta płatkiem gazy przytrzymywanym na miejscu przy pomocy taśmy niedrażniącej. W przypadku gdy bezpośrednie zaaplikowanie badanej substancji chemicznej nie jest niemożliwe (np. w przypadku cieczy lub niektórych past), badana substancja chemiczna powinna zostać najpierw nałożona na gazę, a następnie na skórę. Gaza powinna luźno przylegać do skóry i powinna być przyczepiona do skóry na czas trwania narażenia przy pomocy odpowiedniego opatrunku półokluzyjnego. Jeżeli badana substancja chemiczna została nałożona na płatek gazy, powinna zostać przyczepiona do skóry w sposób zapewniający dobry kontakt i równomierne rozprowadzenie badanej substancji chemicznej na skórze. Należy zapobiec dostępowi zwierzęcia do gazy oraz spożyciu lub inhalacji badanej substancji chemicznej przez zwierzę.

11. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym są na ogół stosowane w stanie nierozcieńczonym. W przypadku badania substancji stałych (które w razie potrzeby można sproszkować) badana substancja chemiczna powinna zostać rozcieńczona przy użyciu minimalnej ilości wody (lub, o ile to konieczne, innego odpowiedniego nośnika), wystarczającej do zapewnienia dobrego kontaktu ze skórą. Jeżeli stosowany jest inny nośnik niż woda, potencjalny wpływ nośnika na podrażnienia skóry przez badaną substancję chemiczną powinien być minimalny lub żaden.

12. O ile to możliwe, na zakończenie okresu narażenia, który na ogół trwa 4 godziny, pozostałości badanej substancji chemicznej powinny zostać usunięte przy użyciu wody lub innego odpowiedniego rozcieńczalnika w sposób pozwalający na uniknięcie zmian w zaistniałej reakcji oraz nienaruszenie naskórka.

▼M8

Poziom dawki

13. Na badany obszar skóry aplikowana jest dawka 0,5 ml cieczy lub 0,5 g ciała stałego lub pasty.

Badanie wstępne (Badanie *in vivo* działania drażniącego/żrącego na skórę przy użyciu jednego zwierzęcia)

14. Jeżeli na podstawie analizy wagi dowodów lub wcześniejszych badań *in vivo* oceniono, że badana substancja chemiczna może mieć działanie żrące, drażniące lub niesklasyfikowane, nie są wymagane dalsze badania *in vivo*. Jednakże w przypadkach gdzie istnieje potrzeba dostarczenia dodatkowych danych, przeprowadza się badanie *in vivo* przy użyciu jednego zwierzęcia z zastosowaniem procedury opisanej poniżej. Na skórę zwierzęcia nakłada się maksymalnie do trzech płatków gazy z badaną substancją. Pierwszy płatek gazy jest usuwany po trzech minutach. Jeżeli nie zaobserwowano żadnych poważnych reakcji skórnych, drugi płatek gazy jest nakładany w innym miejscu i usuwany po godzinie. Jeżeli obserwacje na tym etapie wskazują na to, że narażenie można wydłużyć w sposób humanitarny do czterech godzin, trzeci płatek gazy jest nakładany i zdejmowany po czterech godzinach, a reakcja klasyfikowana punktowo.

15. Jeżeli działanie żrące zostaje stwierdzone po jednym z trzech sekwencyjnych narażeń, badanie zostaje natychmiast przerywane. W przypadku niestwierdzenia działania żrącego po usunięciu ostatniego płatka gazy, zwierzę jest poddawane obserwacji przez okres 14 dni, o ile wcześniej nie rozwinie się uszkodzenie skóry.

16. W przypadku gdy nie przewiduje się, że badana substancja chemiczna może powodować działanie żrące, lecz może wywoływać podrażnienia, należy zaaplikować jednemu zwierzęciu jeden płatek gazy na czas czterech godzin.

Badanie potwierdzające (Badanie *in vivo* działania drażniącego na skórę przy wykorzystaniu dodatkowych zwierząt)

17. W przypadku niestwierdzenia działania żrącego w badaniach wstępnych działanie drażniące lub brak działania należy potwierdzić, wykorzystując maksymalnie dwa dodatkowe zwierzęta i stosując u każdego z nich jedną gazę przez cztery godziny narażenia. W przypadku stwierdzenia działania drażniącego w badaniu wstępnym, badanie potwierdzające może zostać przeprowadzone w sposób sekwencyjny lub poprzez narażenie dwóch dodatkowych zwierząt jednocześnie. W wyjątkowym przypadku nieprzeprowadzania badania wstępnego, można zbadać dwa lub trzy zwierzęta, z których każde zostanie poddane działaniu badanej substancji na jednym płatku gazy, usuniętym następnie po czterech godzinach. Jeżeli w przypadku wykorzystywania dwóch zwierząt, obydwa wykazują te same reakcje, nie wymaga się przeprowadzania dalszych badań. W innym wypadku zbadane zostaje również trzecie zwierzę. Niejednoznaczna reakcja może wymagać oceny z wykorzystaniem dodatkowych zwierząt.

Okres obserwacji

18. Długość trwania obserwacji powinna być wystarczająca do pełnej oceny odwracalności zaobserwowanych efektów. Jednakże eksperyment powinien zostać przerwany, skoro tylko zwierzę zacznie wykazywać trwałe objawy silnego bólu lub stresu. W celu określenia odwracalności skutków zwierzę powinno być obserwowane przez okres maksymalnie 14 dni od usunięcia płatków gazy. W przypadku zaobserwowania odwracalności przed upływem 14 dni, eksperyment powinien zostać przerwany.

Obserwacja kliniczna i ocena punktowa reakcji skóry

19. Zwierzęta powinny zostać zbadane pod kątem wystąpienia objawów rumienia i obrzęku oraz reakcji odnotowanych po 60 minutach, a następnie po 24, 48 oraz 72 godzinach od usunięcia płatka gazy. W badaniu wstępnym przeprowadzanym na jednym zwierzęciu miejsce zaaplikowania badanej substancji chemicznej jest również badane natychmiast po usunięciu płatka gazy. Reakcje skórne są oceniane przy pomocy wartości punktowych i zapisywane zgodnie z punktacją podaną w tabeli poniżej. W przypadku uszkodzenia naskórka, którego nie można zidentyfikować jako działania drażniącego ani żrącego po 72 godzinach, w celu określenia odwracalności efektów konieczne może okazać

▼M8

się prowadzenie obserwacji do 14. dnia. Oprócz spostrzeżeń na temat działania drażniącego należy w pełni opisać i zarejestrować wszelkie miejscowe efekty toksyczne, takie jak odtłuszczenie skóry oraz wszelkie niepożądane skutki ogólnoustrojowe (np. skutki klinicznych objawów toksyczności i utrata masy ciała). Celem wyjaśnienia niejednoznacznych reakcji można posłużyć się badaniem histopatologicznym.

20. Ocena punktowa reakcji skóry jest z konieczności subiektywna. Celem propagowania harmonizacji punktowej oceny reakcji skóry oraz zapewnienia pomocy laboratoriom badawczym oraz osobom zaangażowanym w prowadzenie oraz interpretację obserwacji, personel prowadzący obserwacje powinien być odpowiednio przeszkolony w zakresie stosowanego systemu oceny (zob. tabela poniżej). Pomocne mogą okazać się ilustrowane instrukcje dotyczące klasyfikacji podrażnień i innych uszkodzeń skóry (3).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

21. Streszczenie wyników badań powinno zostać przedstawione w sprawozdaniu końcowym z badań w formie tabeli, która powinna zawierać wszystkie pozycje wymienione w sekcji 24.

Ocena wyników

22. Wynik badania działania drażniącego na skórę powinien być oceniany stosownie do charakteru oraz natężenia uszkodzeń, oraz z uwzględnieniem ich odwracalności lub jej braku. Poszczególne wyniki nie stanowią normy bezwzględnej działania drażniącego na skórę danego materiału, ponieważ ocenie poddawane są również pozostałe skutki narażenia na badany materiał. Poszczególne wyniki powinny natomiast być traktowane jako wartości odniesienia, które muszą być oceniane w świetle wszystkich pozostałych spostrzeżeń z badań.

23. W ocenie uszkodzeń skóry pod uwagę powinna być brana odwracalność zmian skóry. Jeżeli reakcje takie jak alopecja (na ograniczonej powierzchni), hiperkeratoza, hiperplazja i łuszczenie są nadal obecne wraz z upływem 14-dniowego okresu obserwacji, badana substancja chemiczna powinna zostać uznana za drażniącą.

Sprawozdanie z badania

24. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Uzasadnienie badań in vivo:

— analiza wagi dowodów pochodzących z danych z dotychczasowych badań, w tym wyniki strategii badań sekwencyjnych;

— opis odpowiednich danych dostępnych z uprzednio przeprowadzonych badań;

— dane uzyskane w wyniku realizacji każdego etapu strategii badawczej;

— opis przeprowadzonych badań *in vitro*, w tym szczegółowe dane na temat procedur, wyników otrzymanych z zastosowaniem substancji testowych/odniesienia;

— analiza wagi dowodów dla celów przeprowadzenia badania *in vivo*.

Badana substancja chemiczna:

— substancja jednoskładnikowa: dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

▼**M8**

— substancja wieloskładnikowa, mieszanina i substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne (UVCB): opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników;

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— źródło, numer partii (jeżeli dostępny);

— w stosownych przypadkach obróbka badanej substancji chemicznej/substancji kontrolnej przed badaniem (np. ogrzanie, rozdrobnienie);

— stabilność badanej substancji chemicznej, termin przydatności lub data ponownej analizy, jeżeli są znane;

— warunki przechowywania.

Nośnik:

— identyfikacja, stężenie (jeżeli dotyczy) użyta objętość;

— uzasadnienie wyboru nośnika.

Badane zwierzę (zwierzęta):

— wykorzystany gatunek/szczep, uzasadnienie wykorzystania zwierząt innych niż królik albinos;

— liczba zwierząt każdej płci;

— indywidualna masa ciała na początku i na końcu badania,

— wiek na początku badania;

— źródło pochodzenia zwierząt, warunki utrzymywania, pasza itp.

Warunki badania:

— technika przygotowywania miejsc nałożenia płatków gazy;

— szczegółowy opis materiału, z którego wykonane są płatki gazy i sposób ich nakładania;

— szczegóły dotyczące przygotowania, zaaplikowania i usunięcia badanej substancji chemicznej.

Wyniki:

— tabele wyników działania drażniącego/żrącego dla każdego zwierzęcia w każdym punkcie czasowym pomiaru;

— opis wszelkich zaobserwowanych uszkodzeń;

— słowny opis charakteru i stopnia zaobserwowanego działania drażniącego lub żrącego oraz wszystkie wyniki badania histopatologicznego;

— opis innych niekorzystnych zmian miejscowych i ogólnoustrojowych (np. odtłuszczenia skóry) towarzyszących działaniu drażniącemu lub żrącemu.

▼**M8**

Omówienie wyników

Wnioski

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2014). *Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion,* [w:] *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment,* (nr 203), Paryż: Organisation for Economic Cooperation and Development.

(2) OECD (1998) *Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances*, zatwierdzony na 28. wspólnym posiedzeniu komitetu ds. substancji chemicznych i grupy roboczej ds. substancji chemicznych w listopadzie 1998 r.

(3) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation,* [w:] *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 19), Paryż: Organistion for Economic Cooperation and Development.

▼**M8**

Tabela

Punktowa ocena Reakcji skóry

Tworzenie rumienia i obrzęku	
Brak rumienia…	0
Bardzo lekki rumień (prawie niewidoczny)…	1
Dobrze zdefiniowany rumień…	2
Rumień umiarkowany do mocnego…	3
Mocny rumień (czerwień przypominająca barwę mięsa czerwonego) do form obrzęku wykluczających klasyfikację zmiany jako rumienia…	4
Maksymalna możliwa wartość punktowa: 4	
Tworzenie się obrzęku	
Brak obrzęku…	0
Bardzo słaby obrzęk (prawie niewidoczny)…	1
Lekki obrzęk (dobrze wyodrębniony)…	2
Umiarkowany obrzęk (wzniesienie na około 1 mm)…	3
Mocny obrzęk (wniesienie ponad 1 mm, sięgający poza obszar narażenia)…	4
Maksymalna możliwa wartość punktowa: 4	
Celem wyjaśnienia reakcji niejednoznacznych można przeprowadzić badanie histopatologiczne.	

▼**M8**

Dodatek

DEFINICJE

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Działanie drażniące na skórę jest wynikiem odwracalnych uszkodzeń skóry wynikających z zastosowania substancji badanej przez okres do czterech godzin.

Działanie żrące na skórę jest wynikiem nieodwracalnego uszkodzenia skóry; tj. widocznej martwicy przebiegającej przez naskórek w głąb skóry, spowodowanej naniesieniem badanej substancji chemicznej na okres nieprzekraczający czterech godzin. Reakcjami na działanie żrące są wrzody, krwotoki, krwawiące strupy oraz – po zakończeniu 14-dniowej obserwacji – odbarwienia wynikłe ze zblednięcia skóry, obszary jednolitej alopecji, a także blizny. Celem oceny wątpliwych uszkodzeń można przeprowadzić badanie histopatologiczne.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej

▼M7

B.5. DZIAŁANIE ŻRĄCE / SILNIE DRAŻNIĄCE NA OCZY

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 405 (2012). Okresowo dokonuje się przeglądu wytycznych OECD dotyczących badania substancji chemicznych w celu zagwarantowania, że odzwierciedlają one najlepszą dostępną wiedzę naukową. W poprzednich przeglądach przedmiotowej wytycznej dotyczącej badań szczególną uwagę poświęcono możliwym ulepszeniom, dokonując oceny wszystkich dostępnych informacji na temat badanej substancji chemicznej w celu uniknięcia niepotrzebnych badań na zwierzętach laboratoryjnych i tym samym usunięcia wątpliwości związanych z dobrostanem zwierząt. Wytyczna TG nr 405 (przyjęta w 1981 r. i zaktualizowana w latach 1987, 2002 i 2012) obejmuje zalecenie, aby przed rozpoczęciem opisywanego badania działania żrącego / silnie drażniącego na oczy *in vivo* przeprowadzić analizę wagi dowodów (1) na istniejących odpowiednich danych. Jeżeli dostępne dane są niewystarczające, zaleca się opracowanie takich danych za pomocą badań sekwencyjnych (2)(3). Strategia takich badań obejmuje przeprowadzenie zweryfikowanych i zaakceptowanych badań *in vitro* i stanowi dodatek do niniejszej metody badawczej. Do celów rozporządzenia (WE) nr 1907/2006 w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) ([1]) w odnośnym poradniku ECHA uwzględnia się również zintegrowaną strategię badań (21). Badania na zwierzętach należy przeprowadzać tylko wtedy, gdy zostaną uznane za konieczne po rozważeniu dostępnych metod alternatywnych, a korzystanie z nich zostanie uznane za właściwe. W momencie sporządzania niniejszej zaktualizowanej metody badawczej istnieją przypadki, w których zastosowanie tej metody jest nadal konieczne lub wymagane zgodnie z niektórymi ramami regulacyjnymi.

Najnowsza aktualizacja dotyczyła głównie wykorzystania leków przeciwbólowych i środków znieczulających i nie miała wpływu na podstawowe założenia i strukturę wytycznej dotyczącej badań. ICCVAM ([2]) oraz niezależny międzynarodowy panel naukowy ds. wzajemnej oceny dokonały przeglądu przydatności i ograniczeń związanych z rutynowym stosowaniem środków znieczulających miejscowo, leków przeciwbólowych o działaniu ogólnoustrojowym, a także humanitarnego zakończenia procedur podczas badań działania drażniącego na oczy *in vivo* (12). W wyniku przeglądu stwierdzono, że stosowanie środków znieczulających miejscowo i leków przeciwbólowych o działaniu ogólnoustrojowym mogłoby pozwolić częściowo lub całkowicie wyeliminować ból i stres, nie wpływając na wyniki badania, oraz zalecono, aby substancje te były zawsze stosowane. W niniejszej metodzie badawczej uwzględniono ten przegląd. Należy rutynowo stosować środki znieczulające miejscowo, leki przeciwbólowe o działaniu ogólnoustrojowym i humanitarne zakończenie procedur w trakcie badania działania żrącego i silnie drażniącego na oczy *in vivo*. Wyjątki od ich stosowania należy uzasadnić. Udoskonalenia opisane w niniejszej metodzie znacząco zmniejszą lub wyeliminują ból i stres zwierząt podczas większości badań w przypadkach, w których badania bezpieczeństwa dla oczu *in vivo* są nadal konieczne.

Zrównoważone prewencyjne przeciwdziałanie bólowi powinno obejmować (i) rutynowe podawanie środku znieczulającego miejscowo (np. proparakainy lub tetrakainy) i leku przeciwbólowego o działaniu ogólnoustrojowym (np. buprenorfiny) przed podaniem substancji chemicznej, (ii) rutynowe podawanie środka przeciwbólowego o działaniu ogólnoustrojowym (np. buprenorfiny i meloksykamu) po podaniu substancji chemicznej, (iii) zaplanowane obserwacje, monitorowanie i nagrywanie zwierząt w celu zaobserwowania klinicznych objawów bólu lub stresu oraz (iv) zaplanowane obserwacje, monitorowanie i odnotowywanie charakteru, dotkliwości i postępowania wszystkich urazów oczu. Więcej

([1]) Rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) i utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE. Dz.U. L 304 z 22.11.2007, s. 1.

([2]) Amerykański Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych

▼M7

szczegółowych informacji przedstawiono w zaktualizowanych procedurach opisanych poniżej. Po podaniu badanej substancji chemicznej nie należy podawać żadnych dodatkowych środków znieczulających miejscowo ani leków przeciwbólowych w celu uniknięcia zakłócenia badania. Nie należy stosować miejscowo leków przeciwbólowych o działaniu przeciwzapalnym (np. meloksykamu), a stosowane dawki leków o działaniu ogólnoustrojowym nie powinny zakłócać skutków dla oczu.

Definicje zamieszczono w dodatku do metody badawczej.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

Z uwagi na dobrze pojęty interes nauki i dobrostan zwierząt nie należy rozważać przeprowadzania badań *in vivo*, dopóki wszystkie dostępne dane na temat potencjalnego żrącego/drażniącego działania substancji chemicznej na oczy nie zostaną ocenione w ramach analizy wagi dowodów. Tego rodzaju dane obejmują dowody z badań wykonanych na ludziach lub zwierzętach laboratoryjnych, dowody na działanie żrące/drażniące na oczy jednej substancji lub większej liczby strukturalnie powiązanych substancji lub mieszanin takich substancji, dane wskazujące na silną kwasowość lub zasadowość substancji chemicznej (4) (5) oraz wyniki zweryfikowanych i zaakceptowanych badań działania żrącego na skórę i działania żrącego/drażniącego na oczy *in vitro* lub *ex vivo* (6) (13) (14) (15) (16) (17). Takie badania mogą zostać przeprowadzone przed analizą wagi dowodów lub w jej następstwie.

W przypadku niektórych substancji chemicznych taka analiza może wskazywać na potrzebę przeprowadzenia badań potencjału działania żrącego/drażniącego substancji chemicznej na oczy *in vivo*. We wszystkich takich przypadkach, przed rozważeniem zastosowania badania na oczach *in vivo*, najlepszym rozwiązaniem byłoby przeprowadzenie w pierwszej kolejności badania działania żrącego substancji chemicznej na skórę *in vitro* lub *in vivo* oraz przeprowadzenie oceny zgodnie ze strategią badań sekwencyjnych określoną w metodzie badawczej B.4 (7) lub zintegrowaną strategią badań opisaną w poradniku ECHA (21).

Strategię badań sekwencyjnych, która obejmuje przeprowadzenie zweryfikowanych badań działania żrącego/drażniącego na oczy *in vitro* lub *ex vivo*, załączono jako dodatek do niniejszej metody badawczej oraz, do celów rozporządzenia REACH, w poradniku ECHA (21). Zaleca się realizację takiej strategii badań przed podjęciem badań *in vivo*. W przypadku nowych substancji chemicznych zaleca się zastosowanie strategii badań sekwencyjnych do celów opracowania uzasadnionych naukowo danych na temat żrącego/drażniącego działania substancji chemicznej. W odniesieniu do istniejących substancji chemicznych, na temat których brak jest wystarczających danych co do ich działania żrącego/drażniącego na skórę i oczy, strategia ta może zostać wykorzystana w celu uzupełnienia luk w danych. Użycie innej strategii lub procedury badawczej bądź podjęcie decyzji o niezastosowaniu strategii badań sekwencyjnych wymaga uzasadnienia.

ZASADA BADANIA *IN VIVO*

Po wcześniejszym podaniu leku przeciwbólowego o działaniu ogólnoustrojowym i odpowiedniego znieczulenia miejscowego aplikuje się substancję chemiczną, która ma być badana, w pojedynczej dawce na jedno oko zwierzęcia doświadczalnego; drugie oko, na które nie podano substancji chemicznej, służy jako próba kontrolna. Stopień działania drażniącego/żrącego na oczy ocenia się poprzez ocenę zmian patologicznych spojówki, rogówki oraz tęczówki w określonych odstępach czasu. Inne zmiany w oku i niepożądane skutki ogólnoustrojowe są również opisywane w celu uzyskania kompletnej oceny skutków. Czas trwania badania powinien być wystarczający do oceny odwracalności lub nieodwracalności obserwowanych skutków.

Zwierzęta wykazujące oznaki silnego stresu lub bólu na którymkolwiek etapie badań lub oznaki zmian patologicznych kwalifikujące się do humanitarnego zakończenia procedury opisanego w niniejszej metodzie badawczej (zob. pkt 26) należy uśmiercić w sposób humanitarny, a substancję chemiczną należy odpowiednio ocenić. Kryteria podejmowania decyzji o uśmiercaniu zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących silny ból zostały określone w wytycznych OECD (8).

▼M7

PRZYGOTOWANIA DO BADANIA *IN VIVO*

Wybór gatunku

Królik albinos jest preferowanym gatunkiem zwierząt laboratoryjnych. Wykorzystywane są zdrowe młode dorosłe króliki. W przypadku wykorzystania innych szczepów lub gatunków należy podać uzasadnienie.

Przygotowanie zwierząt

Obydwoje oczu zwierzęcia doświadczalnego wstępnie wybranego do badania należy zbadać na 24 godziny przed przystąpieniem do badań. Zwierzęta z objawami podrażnienia oczu, wad wzroku lub istniejących uszkodzeń rogówki nie powinny być wykorzystywane w badaniu.

Warunki utrzymywania i karmienia

Zwierzęta należy utrzymywać oddzielnie. Temperatura w pomieszczeniu dla zwierząt doświadczalnych powinna wynosić 20 °C (± 3 °C) w przypadku królików. Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne z zachowaniem cyklu 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Należy unikać nadmiernego natężenia światła. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody do picia.

PROCEDURA BADAWCZA

Stosowanie środków znieczulających miejscowo i leków przeciwbólowych o działaniu ogólnoustrojowym

Zaleca się stosowanie poniższych procedur w celu uniknięcia lub zminimalizowania bólu i stresu podczas procedur badania bezpieczeństwa dla oczu. Można skorzystać z procedur alternatywnych, które opracowano w celu zapewnienia tak samo dobrych, a nawet lepszych sposobów na uniknięcie bólu i stresu lub ich uśmierzenie.

— Sześćdziesiąt minut przed podaniem badanej substancji chemicznej za pomocą wstrzyknięcia podskórnego podaje się buprenorfinę w ilości 0,01 mg/kg w celu uzyskania terapeutycznego poziomu ogólnoustrojowego działania przeciwbólowego. Z dostępnych danych wynika, że buprenorfina i inne podobne opioidowe leki przeciwbólowe podawane ogólnoustrojowo nie powodują zmiany reakcji oczu ani nie oczekuje się, że spowodują taką zmianę (12).

— Pięć minut przed podaniem badanej substancji chemicznej na każde oko podaje się jedną kroplę lub dwie krople środka znieczulającego miejscowo (np. 0,5-proc. chlorowodorku proparakainy lub 0,5-proc. chlorowodorku tetrakainy). Aby uniknąć możliwego zakłócenia badania, zaleca się stosowanie środka znieczulającego miejscowo, który nie zawiera konserwantów. Oko każdego zwierzęcia, na które zamiast badanej substancji chemicznej podaje się środek znieczulający miejscowo, służy jako próba kontrolna. Jeżeli przewiduje się, że badana substancja chemiczna spowoduje silny ból i stres, danego zwierzęcia nie należy zasadniczo poddawać badaniu *in vivo*. W przypadku wątpliwości lub gdy badanie jest konieczne, należy rozważyć jednak dodatkowe zastosowania środka znieczulającego miejscowo w odstępach pięciominutowych przed podaniem badanej substancji chemicznej. Użytkownicy powinni mieć świadomość, że wielokrotne zastosowania środków znieczulających miejscowo mogą potencjalnie spowodować nieznaczne spotęgowanie działania drażniącego lub wydłużenie czasu potrzebnego do ustąpienia zmian patologicznych wywołanych substancją chemiMetodę badawczą BCOP można wykorzystać do identyfikowania substancji chemicznychczną.

— Osiem godzin po podaniu badanej substancji chemicznej za pomocą wstrzyknięcia podskórnego podaje się buprenorfinę w dawce 0,01 mg/kg i meloksykam w dawce 0,5 mg/kg w celu zapewnienia ciągłego terapeutycznego poziomu ogólnoustrojowego działania przeciwbólowego. Chociaż brakuje danych wskazujących, że meloksykam ma działanie przeciwzapalne na oczy, gdy jest podawany raz dziennie przez wstrzyknięcie podskórne, nie należy podawać go co najmniej 8 godzin po podaniu badanej substancji chemicznej w celu uniknięcia ewentualnego możliwego zakłócenia badania (12).

— Po ośmiu godzinach od podania badanej substancji chemicznej co 12 godzin należy wstrzykiwać podskórnie buprenorfinę w dawce 0,01 mg/kg w połączeniu z meloksykamem w dawce 0,5 mg/kg podawanym co 24 godziny do

▼M7

czasu ustąpienia zmian patologicznych oczu oraz klinicznych objawów bólu i stresu. Dostępne są leki przeciwbólowe o przedłużonym uwalnianiu, których stosowanie można rozważyć w celu zmniejszenia częstotliwości dawkowania leków przeciwbólowych.

— Analgezję „ratunkową” należy zastosować niezwłocznie po podaniu badanej substancji chemicznej, jeżeli analgezja prewencyjna i znieczulenie miejscowe są niewystarczające. Jeżeli zwierzę wykazuje objawy bólu i stresu w trakcie badania, należy niezwłocznie wstrzyknąć podskórnie „ratunkową” dawkę buprenorfiny w ilości 0,03 mg/kg, a następnie powtarzać w razie potrzeby nawet co 8 godzin zamiast dawki 0,01 mg/kg wstrzykiwanej podskórnie co 12 godzin. Meloksykam w dawce 0,5 mg/kg wstrzykuje się podskórnie co 24 godziny w połączeniu z „ratunkową” dawką buprenorfiny, ale nie wcześniej niż po upływie co najmniej 8 godzin od podania badanej substancji chemicznej.

Podawanie badanej substancji chemicznej

Badaną substancję chemiczną należy umieścić na spojówce jednego oka każdego ze zwierząt po delikatnym odsunięciu dolnej powieki z gałki ocznej. Następnie powieki łagodnie przytrzymuje się zamknięte przez mniej więcej jedną sekundę, aby zapobiec utracie materiału. Drugie oko, na które nie podano substancji chemicznej, służy jako próba kontrolna.

Nawilżanie

Oczu zwierząt doświadczalnych nie należy przepłukiwać przez co najmniej 24 godziny po wkropleniu badanej substancji chemicznej, z wyjątkiem badania substancji stałych (zob. pkt 18) i przypadków natychmiastowego działania żrącego lub drażniącego. W stosownych przypadkach po 24 godzinach można przepłukać oczy.

Nie zaleca się stosowania grupy satelitarnej zwierząt w celu zbadania wpływu przepłukiwania, chyba że ma to uzasadnienie naukowe. Jeżeli grupa satelitarna jest potrzebna, należy użyć dwóch królików. Warunki przepłukiwania powinny być dokładnie dokumentowane, np. czas przepłukiwania; skład i temperatura roztworu do przepłukiwania; czas trwania, objętość i szybkość aplikowania.

Poziom dawki

1) *Badanie cieczy*

W badaniu cieczy stosuje się dawkę o objętości 0,1 ml. Nie należy stosować urządzenia rozpylającego do aplikowania substancji chemicznej bezpośrednio na oko. W przypadku aerozolu ciecz należy najpierw rozpylić i zebrać w zbiorniku przed zaaplikowaniem jej na oko w ilości 0,1 ml.

2) *Badanie substancji stałych*

W badaniu substancji stałych, past i cząstek substancji chemicznych stosowana ilość powinna mieć objętość 0,1 ml lub wagę nie większą niż 100 mg. Badaną substancję chemiczną należy zmielić do uzyskania postaci sproszkowanej. Objętość substancji stałej należy mierzyć po delikatnym zbiciu, np. poprzez ostukanie pojemnika pomiarowego. Jeżeli badana substancja chemiczna w postaci stałej nie została usunięta z oka zwierzęcia doświadczalnego w wyniku działania mechanizmów fizjologicznych w pierwszym punkcie czasowym obserwacji po upływie godziny od jej podania, oko można przepłukać roztworem soli fizjologicznej lub wodą destylowaną.

3) *Badanie aerozoli*

Zaleca się, aby wszystkie urządzenia rozpylające i aerozole zostały zebrane przed rozpoczęciem wkraplania do oka. Wyjątek stanowią substancje chemiczne w aerozolach znajdujące się w pojemnikach pod ciśnieniem, których nie można zebrać z powodu parowania. W takich przypadkach należy przytrzymać oko w pozycji otwartej i zaaplikować badaną substancję chemiczną do oka jednym psiknięciem trwającym około sekundy z odległości 10 cm prostopadle do oka. Odległość ta może się różnić w zależności od ciśnienia w rozpylaczu i jego zawartości. Należy uważać, aby nie doszło do uszkodzenia oka z powodu ciśnienia w rozpylaczu. W odpowiednich przypadkach może być niezbędna ocena możliwości potencjalnego „mechanicznego” uszkodzenia oka spowodowanego siłą rozpylacza.

▼M7

Oszacowac dawkę aerozolu można, wykonując następującą symulację badania: substancja chemiczna jest rozpylana na papierku wagowym przez otwór o rozmiarze oka królika znajdujący się bezpośrednio przed papierkiem. Przyrost wagi papierka wykorzystuje się do określenia przybliżonej ilości rozpylonej na oko. W przypadku lotnych substancji chemicznych wielkość dawki można oszacować poprzez zważenie pojemnika odbiorczego przed usunięciem i po usunięciu badanej substancji chemicznej.

Badanie wstępne (badanie działania drażniącego/żrącego na oczy *in vivo* z wykorzystaniem jednego zwierzęcia)

Zaleca się, aby badanie *in vivo* wstępnie wykonywano z wykorzystaniem jednego zwierzęcia (zob. dodatek do niniejszej metody badawczej: Strategia badań sekwencyjnych działania drażniącego i żrącego na oczy). Obserwacje powinny umożliwić określenie dotkliwości i odwracalności zmian przed przystąpieniem do badania potwierdzającego na drugim zwierzęciu.

Jeżeli wyniki tego badania wskazują, że substancja chemiczna jest żrąca lub silnie drażniąca dla oka przy zastosowaniu opisanej procedury, należy zaprzestać dalszego badania działania drażniącego na oczy.

Badanie potwierdzające (badanie działania drażniącego na oczy *in vivo* z wykorzystaniem dodatkowych zwierząt)

W przypadku niezaobserwowania działania żrącego lub silnie drażniącego na oczyw badaniu wstępnym reakcję w postaci działania drażniącego lub reakcję ujemną należy potwierdzić przy wykorzystaniu maksymalnie dwóch dodatkowych zwierząt. W przypadku stwierdzenia działania drażniącego w badaniu wstępnym zaleca się przeprowadzenie badania potwierdzającego w sposób sekwencyjny na każdym ze zwierząt z osobna, a nie narażanie obu dodatkowych zwierząt na działanie badanej substancji jednocześnie. Jeżeli badanie na drugim zwierzęciu ujawni działanie żrące lub silnie drażniące na oczy, badanie nie będzie kontynuowane. Jeżeli wyniki badania drugiego zwierzęcia są wystarczające, aby ustalić klasyfikację pod względem zagrożeń, wówczas nie należy prowadzić żadnych dalszych badań.

Okres obserwacji

Okres obserwacji powinien być wystarczająco długi, aby można było w pełni ocenić siłę i odwracalność obserwowanych skutków. Należy jednak przerwać doświadczenie w momencie, gdy zwierzę wykazuje objawy silnego bólu lub stresu (8). W celu określenia odwracalności skutków zwierzęta należy co do zasady obserwować przez 21 dni po podaniu badanej substancji chemicznej. Jeżeli odwracalność zostanie zaobserwowana przed upływem 21 dni, doświadczenie należy przerwać w tym momencie.

Obserwacje kliniczne i ocena punktowa reakcji oka

Oczy należy dokładnie ocenić pod kątem wystąpienia lub braku zmian patologicznych oczu godzinę po podaniu badanej substancji chemicznej, a następnie należy przeprowadzać takie oceny co najmniej raz dziennie. Zwierzęta należy oceniać kilka razy dziennie przez pierwsze trzy dni, aby upewnić się, że decyzje o przerwaniu badania zostaną podjęte w odpowiednim momencie. Zwierzęta doświadczalne są rutynowo poddawane ocenie przez cały czas trwania badania pod kątem klinicznych objawów bólu lub stresu (np. powtarzające się drapanie lub pocieranie oka, nadmierne mruganie, nadmierne łzawienie) (9) (10) (11), co najmniej dwa razy dziennie, z minimum sześciogodzinnym odstępem między obserwacjami lub częściej w razie potrzeby. Jest to konieczne, aby (i) właściwie ocenić zwierzęta pod kątem wystąpienia bólu i stresu w celu podjęcia świadomych decyzji dotyczących konieczności zwiększenia dawki leków przeciwbólowych oraz aby (ii) ocenić zwierzęta pod kątem dowodów na ustalone humanitarne zakończenie procedury w celu podjęcia świadomych decyzji, czy humanitarne uśmiercenie zwierząt jest właściwym rozwiązaniem, oraz w celu zapewnienia podejmowania takich decyzji w odpowiednim momencie. Wybarwienie fluoresceiną należy stosować rutynowo, a biomikroskop z lampą szczelinową należy stosować w odpowiednich przypadkach (np. przy ocenianiu dotkliwości

▼M7

obrażenia w sytuacji wystąpienia owrzodzenia rogówki) jako wsparcie w wykrywaniu i mierzeniu uszkodzenia oka oraz w celu oceny, czy ustalone kryteria zakończenia procedury w odniesieniu do humanitarnego uśmiercania zostały spełnione. Cyfrowe fotografie zaobserwowanych zmian patologicznych można gromadzić w celach informacyjnych oraz aby zapewnić stałe rejestrowanie skali uszkodzenia oka. Zwierzęta nie powinny być poddawane badaniu dłużej niż to konieczne po uzyskaniu ostatecznych informacji. Zwierzęta wykazujące objawy silnego bólu lub stresu należy bezzwłocznie uśmiercić w sposób humanitarny, a substancję chemiczną należy odpowiednio ocenić.

Zwierzęta, u których po podaniu substancji chemicznej wystąpiły następujące zmiany patologiczne oczu, należy uśmiercić w sposób humanitarny (opis stopni zmian patologicznych znajduje się w tabeli 1): perforacja lub znaczące owrzodzenie rogówki, w tym garbiak; krwawienie z przedniej komory oka; zmętnienia rogówki stopnia 4; brak reakcji na światło (zmiany w tęczówce stopnia 2) utrzymujący się przez 72 godziny; owrzodzenie błony spojówkowej; martwica spojówek lub fałdu półksiężycowatego spojówki; lub tworzenie się strzępów tkanki martwiczej. Wynika to z faktu, że tego typu zmiany patologiczne są na ogół nieodwracalne. Ponadto zaleca się, aby w przypadku wystąpienia zmian patologicznych oczu stosowano humanitarne zakończenie procedury w celu przerwania badań przed zakończeniem planowanego 21-dniowego okresu obserwacji. Uznaje się, że następujące zmiany patologiczne są sygnałem uszkodzeń oka w wyniku działania silnie drażniącego lub żrącego na oczy oraz uszkodzeń, co do których nie oczekuje się, że całkowicie ustąpią do końca 21-dniowego okresu obserwacji: poważne uszkodzenie (np. owrzodzenie rogówki wykraczające poza powierzchniowe warstwy podskórne), zniszczenie rąbka spojówki >50 % (o czym świadczy zbielenie tkanki spojówkowej) oraz poważne zakażenie oka (ropna wydzielina). Połączenie: unaczynienia powierzchni rogówki (tj. łuszczki); powierzchni wybarwienia fluoresceiną, która nie zmniejsza się z czasem na podstawie codziennej oceny; lub braku ponownego nabłonkowania po upływie 5 dni od podania badanej substancji chemicznej także można uznać za potencjalnie użyteczne kryteria, które wpływają na decyzję kliniczną w sprawie wcześniejszego zakończenia badania. Powyższe ustalenia z osobna są jednak niewystarczające do uzasadnienia wcześniejszego zakończenia badania. Po zidentyfikowaniu poważnych skutków dla oczu należy skonsultować się z uczestniczącym w badaniu lub wykwalifikowanym lekarzem weterynarii zajmującym się zwierzętami laboratoryjnymi lub z personelem przeszkolonym w identyfikowaniu klinicznych zmian patologicznych, aby przeprowadzić badanie kliniczne w celu ustalenia, czy połączenie tych skutków uzasadnia wcześniejsze zakończenie badania. Należy określić i odnotować stopnie reakcji oka (spojówki, rogówki i tęczówki) po upływie 1, 24, 48 i 72 godzin od podania badanej substancji chemicznej (tabela 1). Zwierzęta, u których nie wystąpiły zmiany patologiczne oczu, mogą zostać uśmiercone nie wcześniej niż po upływie 3 dni od zaaplikowania substancji. Zwierzęta, u których wystąpiły zmiany patologiczne oczu, które nie są poważne, powinny przebywać pod obserwacją do czasu ustąpienia zmian lub przez 21 dni, po upływie których badanie zostaje zakończone. Obserwacje należy prowadzić i odnotowywać co najmniej po upływie 1, 24, 48 i 72 godzin oraz 7, 14 i 21 dni w celu określenia statusu zmian patologicznych oraz ich odwracalności lub nieodwracalności. W razie konieczności należy prowadzić częstsze obserwacje w celu określenia, czy zwierzę doświadczalne należy uśmiercić ze względów humanitarnych lub wykluczyć z badania z powodu wyników ujemnych.

Po każdym badaniu należy zapisać oceny punktowe zmian patologicznych oczu (tabela 1). Należy również odnotowywać wszelkie inne zmiany patologiczne oczu (np. łuszczka, wybarwienie, zmiany w przedniej komorze) lub niepożądane skutki ogólnoustrojowe.

Badanie reakcji można ułatwić dzięki zastosowaniu lupy dwuokularowej, ręcznej lampy szczelinowej, biomikroskopu lub innego odpowiedniego narzędzia. Po odnotowaniu obserwacji przeprowadzonych po upływie 24 godzin oczy można poddawać dalszym badaniom za pomocą fluoresceiny.

Ocena punktowa reakcji oka jest z konieczności subiektywna. Aby ujednolicić ocenę punktową reakcji oka oraz pomóc laboratoriom badawczym i osobom biorącym udział w przeprowadzaniu i interpretowaniu obserwacji, należy odpowiednio przeszkolić personel przeprowadzający obserwacje w zakresie stosowanego systemu oceny punktowej reakcji.

▼M7

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena wyników

Oceny punktowe działania drażniącego na oczy należy analizować w połączeniu z charakterem i dotkliwością zmian patologicznych oraz ich odwracalnością lub brakiem odwracalności. Poszczególne oceny punktowe nie stanowią normy bezwzględnej właściwości drażniących danej substancji chemicznej, ponieważ ocenie poddawane są również inne skutki działania badanej substancji chemicznej. Ewentualnie poszczególne oceny punktowe należy postrzegać jako wartości odniesienia, które mają znaczenie tylko wtedy, gdy są poparte pełnym opisem i oceną wszystkich obserwacji.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Uzasadnienie badań in vivo: analiza wagi dowodów dotycząca istniejących już danych na temat badania, w tym wyniki badań sekwencyjnych:

— opis odpowiednich danych dostępnych z uprzednio przeprowadzonych badań;

— dane uzyskane na każdym etapie strategii badań;

— opis przeprowadzonych badań *in vitro*, w tym szczegółowe dane na temat procedur, wyników otrzymanych z zastosowaniem badanych substancji chemicznych / substancji chemicznych odniesienia;

— opis przeprowadzonych badań działania drażniącego/żrącego na skórę *in vivo*, wraz z otrzymanymi wynikami;

— analiza wagi dowodów dla celów przeprowadzenia badania *in vivo*.

Badana substancja chemiczna:

— dane identyfikacyjne (np. nazwa systematyczna i, jeżeli jest dostępny, numer CAS, czystość, znane zanieczyszczenia, źródło, numer partii);

— stan skupienia i właściwości fizykochemiczne (np. pH, lotność, rozpuszczalność, stabilność, reaktywność w kontakcie z wodą);

— w przypadku mieszaniny należy określić składniki, w tym dane identyfikacyjne składowych substancji (np. nazwy systematyczne oraz, jeżeli są dostępne, numery CAS) i ich stężenia;

— stosowana dawka.

Nośnik:

— dane identyfikacyjne, stężenie (w stosownych przypadkach), użyta objętość;

— uzasadnienie wyboru nośnika.

Zwierzęta doświadczalne:

— wykorzystany gatunek/szczep, uzasadnienie wykorzystania zwierząt innych niż królik albinos;

— wiek każdego zwierzęcia na początku badania;

— liczba zwierząt każdej płci w grupie badanej i grupach kontrolnych (jeżeli są wymagane);

— masa ciała każdego zwierzęcia na początku i na końcu badania;

— źródło, warunki utrzymywania, pasza itp.

▼M7

Środki znieczulające i leki przeciwbólowe

— dawki i godziny podawania środków znieczulających miejscowo i leków przeciwbólowych o działaniu ogólnoustrojowym;

— jeżeli zastosowano środek znieczulający miejscowo – dane identyfikacyjne, czystość, rodzaj i potencjalne interakcje z badaną substancją chemiczną.

Wyniki:

— opis metody zastosowanej do oceny punktowej działania drażniącego w każdym punkcie czasowym obserwacji (np. ręczna lampa szczelinowa, biomikroskop, fluoresceina);

— tabela danych dotyczących wywołania działania drażniącego/żrącego dla każdego zwierzęcia w każdym punkcie czasowym obserwacji aż do momentu usunięcia każdego zwierzęcia z badania;

— opis stopnia i charakteru obserwowanego działania drażniącego lub żrącego;

— opis wszelkich innych zmian patologicznych zaobserwowanych w oku (np. unaczynienie, formowanie łuszczki, zrosty, wybarwienie);

— opis miejscowych i ogólnoustrojowych niekorzystnych skutków niezwiązanych z oczami, zapis klinicznych objawów bólu i stresu, fotografie cyfrowe i wyniki ewentualnego badania histopatologicznego.

Omówienie wyników

Interpretacja wyników

Ekstrapolacja wyników badań działania drażniącego na oczy zwierząt laboratoryjnych na ludzi jest zasadna tylko w ograniczonym stopniu. W wielu przypadkach królik albinos jest bardziej wrażliwy niż ludzie na działanie drażniące lub żrące na oczy.

Przy interpretacji danych należy pamiętać o wykluczeniu działania drażniącego na oczy będącego wynikiem infekcji wtórnej.

BIBLIOGRAFIA

(1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, sprawozdanie nr 8 z warsztatów ECVAM, ATLA 23, 410–429.

(2) de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159–164.

(3) Worth A.P. i Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161–177.

(4) 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.

(5) 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.

(6) 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, s. 483–524.

(7) Rozdział B.4 niniejszego załącznika, *Ostre działanie drażniące/żrące na skórę*.

▼M7

(8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 19. (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, maj/czerwiec, 20–36.

(10) Krajowa Rada ds. Badań (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Waszyngton, D.C.: The National Academies Press.

(11) Krajowa Rada ds. Badań (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Waszyngton, D.C.: 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, publikacja NIH nr 10-7514, Research Triangle Park, Karolina Północna, Stany Zjednoczone Ameryki: National Institute of Environmental Health Sciences.

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm

(13) Rozdział B.40 niniejszego załącznika, *Badanie działania żrącego na skórę in vitro: test przezskórnej oporności elektrycznej (TER)*

(14) Rozdział B.40a niniejszego załącznika, *Badanie działania żrącego na skórę in vitro: badanie modelu skóry ludzkiej*.

(15) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, Wytyczne OECD dotyczące badania substancji chemicznych, sekcja 4, OECD Paryż.

(16) Rozdział B.47 niniejszego załącznika, *Metoda badania zmętnienia i przepuszczalności rogówki u bydła do celów identyfikacji* (i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu oraz (ii) substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje drażniące oczy lub powodujące poważne uszkodzenie oczu.

(17) Rozdział B.48 niniejszego załącznika, Metoda badania na izolowanym oku kurzym do celów identyfikacji (i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu oraz (ii) substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje drażniące oczy lub powodujące poważne uszkodzenie oczu.

(18) Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (2003). Label Review Manual: wyd. III. EPA737-B-96-001, Waszyngton, D.C.: Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

(19) ONZ (2011), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie czwarte zmienione, Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych.

(20) WE (2008), rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej L 353, s. 1–1355.

(21) Poradnik ECHA dotyczący wymagań w zakresie informacji i oceny bezpieczeństwa chemicznego, rozdział R.7a: Wytyczne dotyczące punktów końcowych.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

Tabela 1

Ocena punktowa zmian patologicznych oka

Rogówka	Ocena punktowa
Zmętnienie: Stopień gęstości (odczyt powinien dotyczyć obszaru o największej gęstości) (*)	
Brak owrzodzenia lub zmętnienia	0
Rozrzucone lub rozmyte obszary zmętnienia (inne niż lekkie zmatowienie normalnego połysku); wyraźnie widoczne elementy tęczówki	1
Łatwo zauważalny obszar półprzezroczysty; lekko zaciemnione elementy tęczówki	2
Obszary o kolorze perłowym; brak widocznych elementów tęczówki; rozmiar źrenicy zwierzęcia trudny do określenia	3
Zmatowienie rogówki; tęczówka niewidoczna z powodu zmętnienia	4
Maksymalna możliwa liczba punktów: 4	
Tęczówka	
w normie	0
Znacząco pogłębiona fałda, przekrwienie, opuchlizna, umiarkowane przekrwienie okołorogówkowe; lub wstrzyknięcie; tęczówka reaguje na światło (przyjmuje się, że powolna reakcja stanowi skutek)	1
Krwotok, silne zniszczenia, lub brak reakcji na światło	2
Maksymalna możliwa liczba punktów: 2	
Spojówka	
Zaczerwienienie (dotyczy spojówki powiekowej i gałkowej; wyłączając rogówkę i tęczówkę)	
w normie	0
Niektóre naczynia krwionośne przekrwione (po wstrzyknięciu)	1
Rozmycie, kolor karmazynowy; pojedyncze naczynia trudno widoczne	2
Rozmycie, kolor mięsa czerwonego	3
Maksymalna możliwa liczba punktów: 3	
Obrzęk spojówki	
Opuchlizna (dotyczy powiek i/lub fałdu półksiężycowatego spojówki)	
w normie	0
Niewielka opuchlizna powyżej normy	1
Widoczna opuchlizna z częściowym wywinięciem powieki	2
Opuchlizna, z powiekami zamkniętymi w połowie	3
Opuchlizna, z powiekami zamkniętymi więcej niż w połowie	4
Maksymalna możliwa liczba punktów: 4	

(*) Należy zapisać obszar zmętnienia rogówki

▼M7

Dodatek

DEFINICJE

Rezerwa kwasowo/zasadow: w przypadku preparatów kwasowych jest to ilość (w g) wodorotlenku sodu na 100 g preparatu wymagana do osiągnięcia określonego pH. W przypadku preparatów zasadowych jest to ilość (w g) wodorotlenku sodu odpowiadająca ilości kwasu siarkowego (w g) na 100 g preparatu wymagana do osiągnięcia określonego pH (Young *et al.* 1988).

Substancja chemiczna: substancja albo mieszanina.

Substancje niewykazujące działania drażniącego: substancje, które nie zostały zaklasyfikowane do kategorii I, II lub III EPA jako drażniące dla oczu; ani do kategorii 1, 2, 2A lub 2B wg GHS jako substancje drażniące dla oczu; lub do unijnej kategorii 1 lub 2 (17) (18) (19).

Substancja żrąca dla oczu: a) substancja chemiczna powodująca nieodwracalne uszkodzenie tkanki oka; b) substancje chemiczne zaklasyfikowane do kategorii 1 wg GHS jako drażniące dla oczu lub do kategorii I EPA jako drażniące dla oczu lub do unijnej kategorii 1 (17) (18) (19).

Substancja drażniąca dla oczu: a) substancja chemiczna, która powoduje odwracalną zmianę w oku; b) substancje chemiczne zaklasyfikowane do kategorii II lub III EPA jako drażniące dla oczu; lub do kategorii 2, 2A lub 2B wg GHS jako substancje drażniące dla oczu; lub do unijnej kategorii 2 (17) (18) (19).

Substancja silnie drażniąca dla oczu: a) substancja chemiczna powodująca uszkodzenie tkanki oka, które nie ustępuje w ciągu 21 dni od podania, lub powodująca poważne fizyczne pogorszenie widzenia; b) substancje chemiczne zaklasyfikowane do kategorii 1 wg GHS jako drażniące dla oczu lub do kategorii I EPA jako drażniące dla oczu lub do unijnej kategorii 1 (17) (18) (19).

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Podejście zintegrowane: strategia badań sekwencyjnych, w ramach której wszystkie istniejące informacje na temat badanej substancji chemicznej są analizowane na każdym poziomie w określonym porządku z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia, przed przejściem do następnego poziomu. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji chemicznej potencjał w zakresie wywołania podrażnienia, dodatkowe badania nie są wymagane. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji nie można przypisać badanej substancji chemicznej potencjału w zakresie wywołania podrażnień, przeprowadza się procedurę badań sekwencyjnych na zwierzętach do momentu, w którym będzie można dokonać jednoznacznej klasyfikacji.

Waga dowodów (proces): mocne i słabe strony zgromadzonych informacji wykorzystuje się jako podstawę do wyciągnięcia wniosku, który może nie wynikać ewidentnie z poszczególnych danych.

▼M7

DODATEK DO METODY BADAWCZEJ B.5 ([1])

STRATEGIA BADAŃ SEKWENCYJNYCH DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO I ŻRĄCEGO NA OCZY

Uwagi ogólne

Zarówno w dobrze pojętym interesie nauki, jak i z uwagi na dobrostan zwierząt istotne jest uniknięcie niepotrzebnego wykorzystywania zwierząt oraz minimalizacja badań mogących powodować silne reakcje u zwierząt. Wszystkie informacje na temat substancji chemicznej istotne z punktu widzenia jej potencjalnego działania drażniącego lub żrącego na oczy powinny zostać poddane ocenie przed podjęciem badań *in vivo*. Możliwe jest, że istnieją wystarczające dowody pozwalające na sklasyfikowanie badanej substancji chemicznej jako potencjalnie drażniącej lub żrącej dla oczu, co sprawia, że przeprowadzanie badań na zwierzętach laboratoryjnych jest zbyteczne. Dlatego wykorzystanie analizy wagi dowodów oraz strategii badań sekwencyjnych zminimalizuje potrzebę prowadzenia badań *in vivo*, zwłaszcza jeżeli substancja chemiczna może powodować silne reakcje.

Zaleca się wykorzystanie analizy wagi dowodów celem oceny istniejących informacji dotyczących działania drażniącego i żrącego na oczy przez substancje chemiczne, a także celem stwierdzenia, czy należy przeprowadzić dodatkowe badania, inne niż badania oka *in vivo*, aby scharakteryzować takie potencjalne działanie substancji. Jeżeli niezbędne są dalsze badania, zaleca się realizowanie strategii badań sekwencyjnych celem uzyskania odpowiednich danych doświadczalnych. W odniesieniu do substancji, które nie posiadają historii badań, należy zastosować strategię badań sekwencyjnych w celu uzyskania danych potrzebnych do oceny ich działania żrącego/drażniącego na oczy. Strategię badań wstępnych opisaną w niniejszym dodatku opracowano podczas warsztatów OECD (1). Następnie została ona potwierdzona i rozszerzona w zharmonizowanym systemie klasyfikacji substancji chemicznych pod względem zagrożeń dla zdrowia ludzi i środowiska oraz zatwierdzona podczas 28. wspólnego posiedzenia Komitetu ds. Substancji Chemicznych i Grupy Roboczej ds. Substancji Chemicznych, które odbyło się w listopadzie 1998 r. (2), i zaktualizowana przez grupę ekspertów OECD w 2011 r.

Pomimo że niniejsza strategia badań nie jest integralną częścią metody badawczej B.5, utożsamia ona zalecane podejście do określania właściwości odpowiadających za działanie drażniące/żrące na oczy. Wspomniane podejście reprezentuje zarówno najlepszą praktykę, jak i wzorzec etyczny dla badań działania drażniącego/żrącego na oczy *in vivo*. Niniejsza metoda badawcza stanowi wytyczne dotyczące prowadzenia badań *in vivo* i określa czynniki, jakim należy poświęcić uwagę przed rozpoczęciem takich badań. Strategia badań sekwencyjnych określa podejście w zakresie wagi dowodów do oceny istniejących danych na temat właściwości substancji chemicznych odpowiadających za działanie drażniące/żrące na oczy oraz zintegrowane podejście do generowania odpowiednich danych dotyczących substancji chemicznych wymagających dodatkowych badań, lub takich, w odniesieniu do których nie przeprowadzono jak dotąd żadnych badań. W ramach tej strategii zaleca się przeprowadzenie zweryfikowanych i zaakceptowanych badań *in vivo* lub *ex vivo*, a dopiero w następnej kolejności zastosowanie metody badawczej B.4 w określonych okolicznościach (3) (4).

Opis strategii badań sekwencyjnych

Przed podjęciem badań w ramach strategii badań sekwencyjnych (rysunek) należy poddać ocenie wszystkie dostępne informacje w celu określenia potrzeby prowadzenia badań *in vivo* na oku. Chociaż z oceny pojedynczych parametrów (np. wartości skrajnych pH) można uzyskać istotne informacje, należy wziąć pod uwagę ogół istniejących informacji. Przy podejmowaniu decyzji dotyczącej wagi

([1]) Zob. również poradnik ECHA dotyczący wymagań w zakresie informacji i oceny bezpieczeństwa chemicznego rozdział R.7a w celu uzyskania informacji na temat wykorzystania zintegrowanej strategii badań działania drażniącego na oczy w ramach rozporządzenia REACH: Wytyczne dotyczące punktów końcowych http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

dowodów należy poddać ocenie wszystkie dane dotyczące skutków działania danej substancji chemicznej lub substancji analogicznych oraz należy przedstawić uzasadnienie podjętej decyzji. W pierwszej kolejności należy położyć nacisk na istniejące dane na temat działania substancji chemicznej na ludzi i zwierzęta, a następnie na wyniki badań *in vitro* lub *ex vivo*. O ile to możliwe, należy unikać badań *in vivo* substancji chemicznych o działaniu żrącym. Czynniki uwzględniane w omawianej strategii badań obejmują:

ocenę istniejących danych na temat ludzi lub zwierząt lub danych z badania *in vitro* uzyskanych na podstawie zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metod (etap 1).

W pierwszej kolejności należy wziąć pod uwagę istniejące dane dotyczące działania na ludzi, np. badania kliniczne lub analizy zawodowe, a także sprawozdania ze studiów przypadków lub dane pochodzące z badań przeprowadzonych na zwierzętach dotyczących działania na oczy lub dane pochodzące ze zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metod badań działania drażniącego/żrącego na oczy *in vitro*, ponieważ dostarczają informacji bezpośrednio związanych z oddziaływaniem na oczy. Następnie należy poddać ocenie dostępne dane uzyskane w wyniku badań prowadzonych na ludziach lub zwierzętach dotyczących działania żrącego/drażniącego na skórę lub badań *in vitro* opartych na zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metodach dotyczących działania żrącego na skórę. Substancje chemiczne, o których wiadomo, że wykazują działanie żrące lub silnie drażniące na oko, nie powinny być aplikowane do oczu zwierząt, podobnie jak substancje chemiczne o działaniu żrącym lub silnie drażniącym na skórę; takie substancje chemiczne należy również uznać za żrące lub drażniące dla oczu. Substancje chemiczne, wobec których istnieją wystarczające dowody, uzyskane w poprzednich badaniach okulistycznych, świadczące o braku działania żrącego i drażniącego, również nie powinny być poddawane badaniu *in vivo* na oku;

analizę zależności struktura-aktywność (SAR) (etap 2).

Należy uwzględnić wyniki badań strukturalnie powiązanych substancji chemicznych, o ile są one dostępne. W przypadku dostępności wystarczających danych na temat oddziaływania na ludzi lub zwierzęta substancji strukturalnie powiązanych lub mieszanin takich substancji, wskazujących na potencjał działania żrącego/drażniącego na oczy, można domniemywać, że badana substancja chemiczna spowoduje taką samą reakcję. W takich przypadkach badanie takiej substancji chemicznej może nie być konieczne. Wyniki ujemne badań dotyczących strukturalnie powiązanych substancji lub mieszanin takich substancji nie są wystarczającym dowodem na brak działania żrącego/drażniącego danej substancji chemicznej w świetle strategii badań sekwencyjnych. Ze zweryfikowanych i zaakceptowanych podejść SAR należy korzystać w celu zidentyfikowania potencjału działania żrącego i drażniącego na skórę i oczy;

właściwości fizykochemiczne i reaktywność chemiczną (etap 3).

Substancje chemiczne charakteryzujące się skrajnym pH, takim jak $\leq$ 2,0 lub $\geq$ 11,5, mogą mieć silne działanie miejscowe. Jeżeli takie skrajne pH jest podstawą do identyfikacji substancji chemicznej jako żrącej lub drażniącej dla oczu, wówczas można również uwzględnić jej rezerwę kwasowo/zasadową (tj. pojemność buforową) (5)(6)(7). Jeżeli pojemność buforowa wskazuje na to, że substancja chemiczna może nie być szkodliwa dla oka (tj. substancje chemiczne ze skrajnym pH i niską rezerwą kwasowo/zasadowa), należy przeprowadzić dalsze badania w celu potwierdzenia tej cechy, najlepiej przy użyciu zweryfikowanych i zaakceptowanych badań *in vitro* lub *ex vivo* (zob. pkt 10);

uwzględnienie innych istniejących informacji (etap 4).

Na tym etapie należy ocenić wszystkie dostępne informacje na temat toksyczności ogólnoustrojowej w kontakcie ze skórą. Ponadto należy uwzględnić ostrą toksyczność skórną powodowaną przez badaną substancję chemiczną. Jeżeli wykazano, że badana substancja chemiczna jest bardzo toksyczna w kontakcie ze skórą, badanie na oku może okazać się zbyteczne. Pomimo że zależność

▼M7

między ostrą toksycznością skórną a działaniem drażniącym/żrącym na oczy nie zawsze jest oczywista, można założyć, że jeśli czynnik jest bardzo toksyczny w kontakcie ze skórą, będzie wykazywał wysoką toksyczność po zaaplikowaniu na oko. Dane na ten temat mogą również zostać rozpatrzone pomiędzy etapami 2 i 3;

ocenę działania żrącego na skórę substancji chemicznej, o ile jest to wymagane do celów regulacyjnych (etap 5).

W pierwszej kolejności potencjał działania żrącego i silnie drażniącego na skórę należy ocenić zgodnie z metodą badawczą B.4 (4) i towarzyszącym jej dodatkiem (8), w tym z wykorzystaniem zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metod badania działania żrącego na skórę *in vitro* (9) (10) (11). Jeżeli okaże się, że substancja chemiczna ma działanie żrące lub silne drażniące na skórę, można również uznać, że jest żrąca lub silnie drażniąca dla oka. W związku z powyższym dalsze badania nie będą wymagane. Jeżeli substancja chemiczna nie działa żrąco ani silnie drażniąco na skórę, należy przeprowadzić badania na oku *in vitro* lub *ex vivo*;

wyniki uzyskane z badań *in vitro* lub *ex vivo* (etap 6).

Substancje chemiczne wykazujące właściwości żrące lub silnie drażniące w badaniach *in vitro* lub *ex vivo* (12) (13), które zostały zweryfikowane i zaakceptowane na szczeblu międzynarodowym na potrzeby oceny działania żrącego/drażniącego na skórę lub oko, nie muszą być badane na zwierzętach. Można założyć, że takie substancje chemiczne spowodują podobnie silne reakcje *in vivo*. Jeżeli zweryfikowane i zaakceptowane badania *in vitro*/*ex vivo* nie są dostępne, należy pominąć etap 6 i przejść bezpośrednio do etapu 7;

badania na królikach *in vivo* (etap 7 i 8):

badania na oczach *in vivo* powinny rozpoczynać się od badań wstępnych z wykorzystaniem jednego zwierzęcia. Jeżeli wyniki tych badań wskazują, że substancja chemiczna jest silnie drażniąca lub żrąca dla oczu, dalsze badania powinny zostać wstrzymane. Jeżeli badanie nie wykazuje żadnego działania żrącego ani silnie drażniącego, należy przeprowadzić badanie potwierdzające z wykorzystaniem dwóch dodatkowych zwierząt. W zależności od wyników badania potwierdzającego konieczne może być przeprowadzenie dalszych badań [zob. metoda badawcza B.5].

▼M7

STRATEGIA BADAŃ I OCENY DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO I ŻRĄCEGO NA OCZY

	Działanie	Ustalenie	Wniosek
1	Istniejące dane na temat ludzi lub zwierząt lub dane z badania *in vitro* uzyskane na podstawie zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metod, które przedstawiają skutki dla oczu	Poważne uszkodzenie oczu	Szczytowy punkt końcowy; uznać substancję za żrącą dla oczu. Nie wymaga badań.
		Działanie drażniące na oczy	Szczytowy punkt końcowy; uznać substancję za drażniącą dla oczu. Nie wymaga badań.
		Brak działania żrącego/drażniącego na oczy	Szczytowy punkt końcowy; uznać brak działania żrącego i drażniącego dla oczu. Nie wymaga badań.
	Istniejące dane na temat ludzi lub zwierząt lub dane z badania *in vitro* uzyskane na podstawie zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metod, które przedstawiają działanie żrące na skórę	Działanie żrące na skórę	Założyć działanie żrące na oczy. Nie wymaga badań.
	Istniejące dane na temat ludzi lub zwierząt lub dane z badania *in vitro* uzyskane na podstawie zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metod, które przedstawiają działanie silnie drażniące na skórę	Silne działanie drażniące na skórę	Założyć działanie drażniące na oczy. Nie wymaga badań.
	↓		
	Brak dostępnych informacji lub dostępne informacje są niejednoznaczne		
	↓		
2	Przeprowadzić SAR pod kątem działania żrącego/drażniącego na oczy	Przewidzieć poważne uszkodzenie oczu	Założyć działanie żrące na oczy. Nie wymaga badań.
		Przewidzieć działanie drażniące na oczy	Założyć działanie drażniące na oczy. Nie wymaga badań.
	Rozważyć SAR w odniesieniu do działania żrącego na skórę	Przewidzieć działanie żrące na skórę	Założyć działanie żrące na oczy. Nie wymaga badań.
	↓		
	Nie można dokonać żadnych prognoz albo prognozy nie są jednoznaczne ani ujemne		
	↓		
3	Zmierzyć pH (uwzględnić pojemność buforową, w stosownych przypadkach)	pH ≤ 2 lub ≥ 11,5 (przy wysokiej pojemności buforowej, w stosownych przypadkach)	Założyć działanie żrące na oczy. Nie wymaga badań.
	↓		
	2 < pH < 11,5, or pH ≤ 2,0 lub ≥ 11,5 przy niskiej/braku pojemności buforowej, w stosownych przypadkach		
	↓		
4	Uznać istniejące dane na temat toksyczności ogólnoustrojowej w kontakcie ze skórą	Wysoka toksyczność przy stężeniach, które byłyby testowane na oku.	Substancja chemiczna byłaby zbyt toksyczna, aby przeprowadzić badanie. Nie wymaga badań.

▼M7

	Działanie	Ustalenie	Wniosek
	↓		
	Brak informacji na ten temat lub substancja chemiczna nie jest wysoce toksyczna.		
	↓		
5	Ocenić w doświadczeniu potencjał działania żrącego na skórę zgodnie ze strategią badań opisaną w rozdziale B.4 niniejszego załącznika, jeżeli jest to wymagane również do celów regulacyjnych	Reakcja w postaci działania żrącego lub silnie drażniącego	Założyć działanie żrące na oczy. Nie wymaga dalszych badań.
	↓		
	Substancja chemiczna nie działa żrąco ani silnie drażniąco na skórę		
	↓		
6	Przeprowadzić zweryfikowane i zaakceptowane badania na oku *in vitro* lub *ex vivo*	Reakcja w postaci działania żrącego lub silnie drażniącego	Założyć działanie żrące lub silnie drażniące na oczy, pod warunkiem że przeprowadzone badanie(-a) można wykorzystać do identyfikacji substancji żrących/silnie drażniących, a substancja chemiczna wchodzi w zakres dziedziny zastosowania badania lub badań. Nie wymaga dalszych badań.
		Reakcja w postaci działania drażniącego	Założyć działanie drażniące na oczy, pod warunkiem że przeprowadzone badanie(-a) można wykorzystać do prawidłowej identyfikacji substancji żrących, silnie drażniących i drażniących, a substancja chemiczna wchodzi w zakres dziedziny zastosowania badania lub badań. Nie wymaga dalszych badań.
		Reakcja w postaci działania niedrażniącego	Założyć brak działania drażniącego na oczy, pod warunkiem że przeprowadzone badanie(-a) można wykorzystać do prawidłowej identyfikacji substancji żrących, silnie drażniących lub drażniących dla oczu, a substancja chemiczna wchodzi w zakres dziedziny zastosowania badania. Nie wymaga dalszych badań.
	↓		
	Zweryfikowanych i zaakceptowanych badań na oku in vitro lub ex vivo nie można wykorzystać do sformułowania wniosku		
	↓		

▼M7

	Działanie	Ustalenie	Wniosek
7	Przeprowadzić badanie wstępne na oku królika *in vivo* z wykorzystaniem jednego zwierzęcia ↓ *Brak poważnych uszkodzeń lub brak reakcji* ↓	Poważne uszkodzenie oczu	Uznać substancję za żrącą dla oczu. Nie wymaga dalszych badań.
8	Przeprowadzić badanie potwierdzające z wykorzystaniem jednego dodatkowego zwierzęcia lub dwóch dodatkowych zwierząt.	Działanie żrące lub drażniące	Uznać substancję za żrącą lub drażniącą dla oczu. Nie wymaga dalszych badań.
		Brak działania żrącego lub drażniącego	Uznać brak działania drażniącego i żrącego dla oczu. Nie wymaga dalszych badań.;

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Sprawozdanie końcowe z warsztatów OECD na temat harmonizacji kryteriów weryfikowania i akceptowania w odniesieniu do alternatywnych toksykologicznych metod badawczych. Warsztaty odbyły się w Solnej w Szwecji w dniach 22–24 stycznia 1996 r. (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, zatwierdzony podczas 28. wspólnego posiedzenia Komitetu ds. Substancji Chemicznych i Grupy Roboczej ds. Substancji Chemicznych, które odbyło się w listopadzie 1998 r. (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. i Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161–177.

(4) Rozdział B.4 niniejszego załącznika, Ostre działanie drażniące/żrące na skórę.

(5) 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.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. i 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, s. 483–524.

(7) 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.

8) Dodatek do rozdziału B.4 niniejszego załącznika – Strategia badań sekwencyjnych działania drażniącego i żrącego na oczy.

(9) Rozdział B.40 niniejszego załącznika, Badanie działania żrącego na skórę *in vitro*: test przezskórnej oporności elektrycznej (TER).

(10) Rozdział B.40a niniejszego załącznika, Badanie działania żrącego na skórę *in vitro*: badanie modelu skóry ludzkiej.

(11) OECD (2006), badanie nr 435: *In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, Wytyczne OECD dotyczące badania substancji chemicznych, sekcja 4, OECD Paryż.

▼**M7**

(12) Rozdział B.47 niniejszego załącznika, Metoda badania zmętnienia i przepuszczalności rogówki u bydła do celów identyfikacji substancji żrących i silnie drażniących dla oczu.

(13) Rozdział B.48 niniejszego załącznika, Metoda badania na izolowanym oku kurzym do celów identyfikacji substancji żrących i silnie drażniących dla oczu.

▼B

B.6. **SENSYBILIZACJA SKÓRY**

1. **METODA**

1.1. WPROWADZENIE

Uwagi:

Czułość i zdolność testów do wykrywania potencjalnych sensybilizatorów ludzkiej skóry uważa się za ważne w systemie klasyfikacji toksyczności odnoszącej się do zdrowia publicznego.

Nie ma jednej metody badania, która właściwie zidentyfikuje wszystkie substancje z potencjałem do sensybilizowania ludzkiej skóry i która odnosi się do wszystkich substancji.

Czynniki, takie jak fizyczne charakterystyki substancji, w tym jej zdolność do wnikania w skórę, muszą być wzięte pod uwagę przy wyborze testu.

Są wykorzystywane dwa typy testów stosujących świnki morskie: testy ze środkiem wspomagającym, w których stan alergiczny jest potęgowany przez rozpuszczenie lub utworzenie zawiesiny substancji testowanej w kompletnym środku wspomagającym Freunda (FCA), i testy niewspomagane.

Testy ze środkiem wspomagającym mogą być bardziej precyzyjne w przewidywaniu prawdopodobnego działania substancji prowadzącego do sensybilizacji skóry u ludzi niż metody nie stosujące kompletnego środka wspomagającego Freunda i są zatem metodami preferowanymi.

Test maksymalizacyjny świnki morskiej (GPMT) jest szeroko stosowanym testem ze środkiem wspomagającym. Pomimo iż kilka innych metod może być wykorzystanych w celu wykrycia potencjału substancji do wywołania reakcji sensybilizacji skóry, GPMT uważa się za preferowaną technikę wspomagającą.

W przypadku wielu kategorii związków chemicznych testy niewspomagane (preferowany jest test Buehlera) uważa się za mniej czułe.

W niektórych przypadkach mogą istnieć słuszne powody wyboru testu Buehlera, wymagającego aplikowania miejscowego zamiast iniekcji śródskórnej, wykorzystywanej w teście maksymalizacyjnym świnki morskiej. W przypadku stosowania testu Buehlera powinno być podane naukowe uzasadnienie.

Test maksymalizacyjny świnki morskiej (GPMT) i test Buehlera są opisane w niniejszej metodzie. Inne metody mogą być stosowane, pod warunkiem że są potwierdzone i podane jest naukowe uzasadnienie.

Jeżeli uzyskano wynik pozytywny w ogólnie przyjętym badaniu sortującym, substancja testowana może być nazwana potencjalnym sensybilizatorem i przeprowadzanie testu świnki morskiej może nie być konieczne. Jednakże jeżeli uzyskano wynik negatywny w takim teście, test świnki morskiej musi zostać przeprowadzony, z zastosowaniem procedury opisanej w tej metodzie badania.

Zob. także Wprowadzenie ogólne w części B.

▼B

1.2. DEFINICJE

Sensybilizacja skóry: (alergiczne kontaktowe zapalenie skóry) jest immunologiczną reakcją skórną na substancję. U ludzi reakcje mogą charakteryzować się swędzeniem, rumieniem, obrzękiem, grudkami, pęcherzykami, wzniesieniami naskórka wypełnionymi przezroczystą, wodną cieczą lub połączeniem tych objawów. W przypadku innych gatunków reakcje mogą się różnić i mogą być zaobserwowane tylko rumień i obrzęk.

Ekspozycja indukcyjna: eksperymentalna ekspozycja podmiotu na substancję testowaną z zamiarem wywołania stanu nadwrażliwego.

Okres indukcji: okres co najmniej jednego tygodnia następujący po ekspozycji indukcyjnej, podczas którego stan nadwrażliwy może się rozwinąć.

Ekspozycja prowokacyjna: eksperymentalna ekspozycja podmiotu poddanego wcześniej działaniu substancji testowanej, następująca po okresie indukcji w celu ustalenia, czy podmiot reaguje w sposób nadwrażliwy.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Czułość i niezawodność stosowanej techniki eksperymentalnej powinna być oceniana co sześć miesięcy przez zastosowanie substancji, o których wiadomo, że mają właściwości od słabej do miarkowanej sensybilizacji skóry.

We właściwie przeprowadzonym teście powinno się spodziewać reakcji co najmniej 30 % w teście ze środkiem wspomagającym i co najmniej 15 % w teście niewspomaganym dla słabych/umiarkowanych sensybilizatorów.

Preferowane są następujące substancje:

Numery CAS	Numery EINECS	Nazwy EINECS	Nazwy zwyczajowe
101-86-0	202-983-3	aldehyd α-heksylocynamonowy	aldehyd α-heksylocynamonowy
149-30-4	205-736-8	benzotiazolo-2-tiol (2-merkapto-benzotiazol)	kaptaks
94-07-7	202-303-5	anestezyna	nordcaine

Mogą istnieć sytuacje, w których, biorąc pod uwagę zadowalające uzasadnienie, mogą być stosowane inne substancje kontrolne spełniające powyższe kryteria.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Zwierzęta badane są początkowo poddane działaniu substancji testowanej przez śródskórne iniekcje i/lub aplikowanie naskórkowe (ekspozycja indukcyjna). W następstwie 10- do 14-dniowego okresu odpoczynku (okres indukcji), podczas którego może się rozwinąć reakcja odpornościowa, zwierzęta są poddane działaniu dawki prowokacyjnej. Rozmiar i stopień reakcji skórnej na ekspozycję prowokacyjną u zwierząt badanych jest porównywany ze wykazywanym przez zwierzęta kontrolne, które są poddawane pozorowanej terapii podczas indukcji i ulegają ekspozycji prowokacyjnej.

1.5. OPIS METOD BADANIA

Jeżeli uważa się za konieczne usunięcie substancji testowanej, powinno ono być dokonane przy użyciu wody lub odpowiedniego rozpuszczalnika, bez zmiany istniejącej reakcji lub integralności naskórka.

▼B

1.5.1. *Test maksymalizacyjny świnki morskiej (GPMT)*

1.5.1.1. P r z y g o t o w a n i a

Zdrowe, młode, dorosłe, albinotyczne osobniki świnki morskiej są aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem testu. Przed testem zwierzęta są losowo przydzielane do grup. Sierść jest usuwana przez strzyżenie, golenie lub możliwie przez chemiczną depilację, zależnie od stosowanej metody badania. Przedmiotem troski powinno być unikanie otarcia skóry. Zwierzęta są ważone przed rozpoczęciem i na końcu testu.

1.5.1.2. W a r u n k i t e s t u

1.5.1.2.1. Zwierzęta badane

Wykorzystywane są powszechnie używane laboratoryjne rasy albinotyczne świnek morskich.

1.5.1.2.2. Liczba i płeć

Samce i/lub samice zwierząt mogą być wykorzystane. Jeżeli wykorzystane są samice, powinny one być niecięŜarne i takie, które nie rodziły.

W grupie badanej jest wykorzystane co najmniej 10 zwierząt i co najmniej 5 zwierząt w grupie kontrolnej. Jeżeli użyto mniej niż 20 badanych i 10 kontrolnych świnek morskich i nie jest możliwy wniosek, że testowana substancja jest sensybilizatorem, zdecydowanie zalecane jest badanie dodatkowych zwierząt, aby otrzymać w sumie co najmniej 20 badanych i 10 kontrolnych zwierząt.

1.5.1.2.3. Poziomy dawki

Stężenie substancji testowanej stosowane przy każdej ekspozycji indukcyjnej powinno być systematycznie dobrze tolerowane i powinno być najwyższe, powodujące od słabego do umiarkowanego podrażnienia skóry. Stężenie stosowane przy ekspozycji prowokacyjnej powinno być najwyższą dawką niedrażniącą. Jeżeli konieczne, właściwe stężenia mogą być określone na podstawie badania pilotażowego wykorzystującego dwa lub trzy zwierzęta. W tym celu powinno być rozważone wykorzystanie zwierząt poddanych działaniu FCA.

1.5.1.3. P r o c e d u r a

1.5.1.3.1. Indukcja

Dzień 0 – grupa badana

Trzy pary śródskórnych iniekcji o objętości 0,1 ml są podawane w okolicę barku, która jest oczyszczona z sierści tak, aby iniekcje każdej pary leżały po obu stronach linii środkowej.

Iniekcja 1: mieszanina 1:1 (objętościowo) FCA/woda lub fizjologiczny roztwór soli.

Iniekcja 2: substancja testowana w odpowiednim nośniku w wybranym stężeniu.

Iniekcja 3: substancja testowana przygotowana w wybranym stężeniu w mieszaninie 1:1 (objętościowo) FCA/woda lub fizjologicznym roztworze soli.

W iniekcji 3 substancje rozpuszczalne w wodzie są rozpuszczane w fazie wodnej przed zmieszaniem z FCA. Przygotowuje się zawiesinę w FCA substancji rozpuszczalnych w tłuszczach i nierozpuszczalnych przed połączeniem z fazą wodną. Końcowe stężenie substancji testowanej musi być równe stężeniu użytemu w iniekcji 2.

▼B

Iniekcje 1 i 2 są podawane blisko siebie i najbliżej głowy, podczas gdy 3 jest podawana w kierunku części ogonowej powierzchni badanej.

Dzień 0 – grupa kontrolna

Trzy pary śródskórnych iniekcji o objętości 0,1 ml są podawane w te same miejsca, co u zwierząt badanych.

Iniekcja 1: mieszanina 1:1 (objętościowo) FCA/woda lub fizjologiczny roztwór soli.

Iniekcja 2: nierozcieńczony nośnik.

Iniekcja 3: Preparat nośnika o stężeniu wagowym 50 % w mieszaninie 1:1 (objętościowo) FCA/woda lub fizjologicznym roztworze soli.

Dzień 5–7 – grupy badana i kontrolna

Na około 24 godziny przed zastosowaniem miejscowej indukcji, jeżeli substancja nie jest środkiem drażniącym skórę, badana powierzchnia, po dokładnym strzyżeniu i/lub goleniu, jest poddawana działaniu 0,5 ml laurylosiarczanu (VI) sodu w wazelinie o stężeniu 10 %, w celu wywołania miejscowego podrażnienia.

Dzień 6–8 – grupa badana

Powierzchnia badana jest ponownie oczyszczana z sierści. Bibuła filtracyjna (2 × 4 cm) jest dokładnie pokrywana substancją testowaną w odpowiednim nośniku oraz nakładana na powierzchnię badaną i utrzymywana w kontakcie za pomocą szczelnego opatrunku przez 48 godzin. Wybór nośnika powinien być uzasadniony. Substancje stałe są drobno rozcierane i łączone z odpowiednim nośnikiem. Ciecze mogą być stosowane bez rozcieńczania, jeżeli właściwe.

Dzień 6–8 – grupa kontrolna

Powierzchnia badana jest ponownie oczyszczana z sierści. Nakładany jest tylko nośnik, w podobny sposób na powierzchnię badaną i utrzymywany w kontakcie za pomocą szczelnego opatrunku przez 48 godzin.

1.5.1.3.2. Prowokacja

Dzień 20–22 – grupa badana i kontrolna

Boki badanych i kontrolnych zwierząt są oczyszczane z sierści. Łata lub komora wypełniona substancją testowaną jest nakładana na jeden bok zwierząt oraz, w odpowiednim przypadku, łata lub komora wypełniona tylko nośnikiem może być nałożona na drugi bok. Łaty są utrzymywane w kontakcie za pomocą szczelnego opatrunku przez 24 godziny.

1.5.1.3.3. Obserwacja i klasyfikacja: grupy: badana i kontrolna:

— około 21 godzin po usunięciu łaty powierzchnia prowokacji jest czyszczona i dokładnie strzyżona i/lub golona i, jeżeli to konieczne, depilowana,

— około 3 godzin później (w przybliżeniu 48 godzin od początku stosowania prowokacji) reakcja skóry jest obserwowana i odnotowywana zgodnie z klasami wskazanymi w dodatku,

— około 24 godziny po tej obserwacji przeprowadza się drugą obserwację (72 godziny) i ponownie odnotowuje.

Ślepy odczyt wyników badań zwierząt badanych i kontrolnych jest wskazany.

Jeżeli konieczne jest wyjaśnienie wyników otrzymanych w pierwszej prowokacji, powinna być rozważona druga prowokacja (tj. powtórna prowokacja), gdzie właściwe z nową grupą kontrolną, w przybliżeniu jeden tydzień po pierwszej. Powtórna prowokacja może być również przeprowadzona na pierwotnej grupie kontrolnej.

▼B

Wszystkie reakcje skórne i jakiekolwiek niezwykłe wyniki badań, w tym reakcje ogólnoustrojowe, wynikające z procedur indukcji i prowokacji powinny być obserwowane i odnotowywane zgodnie ze skalą klasyfikacyjną Magnusson/Kligman (zob. dodatek). W celu wyjaśnienia wątpliwych reakcji mogą być przeprowadzone inne procedury, np. badanie histopatologiczne, pomiar grubości fałdy skórnej.

1.5.2. *Test Buehlera*

1.5.2.1. Przygotowania

Zdrowe, młode, dorosłe, albinotyczne osobniki świnki morskiej są aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem testu. Przed testem zwierzęta są losowo przydzielane do grup. Sierść jest usuwana przez strzyżenie, golenie lub możliwie przez chemiczną depilację, zależnie od stosowanej metody badania. Należy uważać, aby uniknąć otarcia skóry. Zwierzęta są ważone przed rozpoczęciem i na końcu testu.

1.5.2.2. Warunki testu

1.5.2.2.1. Zwierzęta badane

Wykorzystywane są powszechnie używane laboratoryjne rasy albinotyczne świnek morskich.

1.5.2.2.2. Liczba i płeć

Mogą być wykorzystane samce i/lub samice zwierząt. Jeżeli wykorzystane są samice, powinny one być nieciężarne i takie, które nie rodziły.

W grupie badanej jest wykorzystanych co najmniej 20 zwierząt i co najmniej 10 zwierząt w grupie kontrolnej.

1.5.2.2.3. Poziomy dawki

Stężenie substancji testowanej stosowane przy każdej ekspozycji indukcyjnej powinno być możliwie najwyższe, by spowodować słabe, ale nie nadmierne podrażnienie. Stężenie stosowane przy ekspozycji prowokacyjnej powinno być najwyższą dawką niedrażniącą. Jeżeli konieczne, właściwe stężenia mogą być wyznaczone na podstawie badania pilotażowego wykorzystującego dwa lub trzy zwierzęta.

W przypadku materiałów testowanych rozpuszczalnych w wodzie, właściwe jest stosowanie jako nośnika wody lub rozcieńczonego niedrażniącego roztworu środka powierzchniowo czynnego. W przypadku innych materiałów testowanych 80 % roztwór etanol/woda jest preferowany dla indukcji i aceton dla prowokacji.

1.5.2.3. Procedura

1.5.2.3.1. Indukcja

Dzień 0 – grupa badana

Jeden bok jest oczyszczany z sierści (dokładne strzyżenie). System łat powinien być całkowicie wypełniony substancją testowaną w odpowiednim nośniku (wybór nośnika powinien być uzasadniony; ciekłe substancje testowane mogą być stosowane bez rozcieńczania, jeżeli właściwe).

System łat jest nakładany na powierzchnię testowaną i utrzymywany w kontakcie ze skórą za pomocą szczelnej łaty lub komory i odpowiedniego opatrunku przez 6 godzin.

▼B

System łat musi być szczelny. Odpowiedni jest bawełniany tampon, który może być okrągły lub kwadratowy, o przybliżonej powierzchni 4–6 cm^2. W celu zapewnienia szczelności preferowane jest unieruchomienie badanego osobnika przy użyciu odpowiedniego elementu unieruchamiającego. Jeżeli zastosowane jest owijanie, mogą być potrzebne dodatkowe ekspozycje.

Dzień 0 – grupa kontrolna

Jeden bok jest oczyszczany z sierści (dokładne strzyżenie). Nakładany jest tylko nośnik, w sposób podobny do stosowanego w doniesieniu do grupy badanej. System łat jest utrzymywany w kontakcie ze skórą za pomocą szczelnej łaty lub komory i odpowiedniego opatrunku przez 6 godzin. Jeżeli można wykazać, że nie jest konieczna symulowana grupa kontrolna, można się posłużyć naturalną grupą kontrolną.

Dzień 6–8 i 13–15 – grupa badana i kontrolna

Przeprowadza się takie samo aplikowanie jak w dniu 0, na tę samą powierzchnię badaną (oczyszczenie z sierści w razie konieczności) tego samego boku, w dniu 6–8 i ponownie w dniu 13–15.

1.5.2.3.2. Prowokacja

Dzień 27–29 – grupa badana i kontrolna

Bok zwierząt badanych i kontrolnych, który nie był wykorzystywany do badania, jest oczyszczany z sierści (dokładne strzyżenie). Na zadnią część nieużywanego boku zwierząt badanych i kontrolnych nakładana jest łata lub komora, zawierająca odpowiednią ilość substancji testowanej w maksymalnym niedrażniącym stężeniu.

Jeżeli ma to znaczenie, szczelna łata lub komora tylko z nośnikiem jest również nakładana na przednią część nieużywanego boku zarówno badanych, jak i kontrolnych zwierząt. Łaty i komory są utrzymywane w kontakcie ze skórą za pomocą odpowiedniego opatrunku przez 6 godzin.

1.5.2.3.3. Obserwacja i klasyfikacja:

— około 21 godzin po usunięciu łaty powierzchnia prowokowana jest oczyszczana z sierści,

— około 3 godziny później (w przybliżeniu 30 godzin po przyłożeniu łaty prowokującej) reakcje skórne są obserwowane i odnotowywane zgodnie z klasami wskazanymi w dodatku,

— około 24 godziny później po 30-godzinnej obserwacji (w przybliżeniu 54 godziny po przyłożeniu łaty prowokującej) reakcje skórne są ponownie obserwowane i odnotowywane.

Ślepy odczyt zwierząt badanych i kontrolnych jest wskazany.

Jeżeli konieczne jest wyjaśnienie wyników otrzymanych z pierwszej prowokacji, powinna być rozważona druga prowokacja (tj. powtórna prowokacja), gdzie właściwe, z nową grupą kontrolną, w przybliżeniu jeden tydzień po pierwszej. Powtórna prowokacja może być również przeprowadzona na pierwotnej grupie kontrolnej.

▼B

Wszystkie reakcje skórne i jakiekolwiek nietypowe wyniki badań, w tym reakcje ogólnoustrojowe, wynikające z procedur indukcji i prowokacji powinny być zaobserwowane i odnotowywane zgodnie ze skalą klasyfikacyjną Magnusson/Kligman (zob. dodatek). W celu wyjaśnienia wątpliwych reakcji mogą być przeprowadzone inne procedury, np. badanie histopatologiczne, pomiar grubości fałdy skórnej.

2. **DANE (GPMT i test buehlera)**

Dane powinny być podsumowane w formie tabeli, przedstawiając reakcje skórne każdego zwierzęcia podczas każdej obserwacji.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA (GPMT I TEST BUEHLERA)**

Jeżeli jest wykonana próba sortująca przed testem świnki morskiej, muszą być podane opis i odniesienie do testu (np. miejscowa próba węzła chłonnego (LLNA), test obrzęku ucha myszy (MEST)), w tym szczegóły procedury, wraz z wynikami testu, oraz wynikami zastosowania substancji odniesienia.

Sprawozdanie z testu (GMPT i test Buehlera)

Sprawozdanie z testu obejmuje, jeżeli możliwe, następujące informacje:

Zwierzęta badane:

— wykorzystana rasa świnki morskiej,

— liczba, wiek i płeć zwierząt,

— źródło, warunki, w których przebywają zwierzęta, dieta itp.,

— indywidualna waga zwierząt na początku testu.

Warunki testu:

— technika przygotowania miejsca przyłożenia łaty,

— szczegóły dotyczące materiału łaty i techniki jej przykładania,

— wynik badania pilotażowego z wnioskiem, dotyczącym stężeń indukcyjnych i prowokacyjnych, które mają być zastosowane w teście,

— szczegóły dotyczące przygotowania, aplikowania i usuwania substancji testowanej,

— uzasadnienie wyboru nośnika,

— stężenia nośnika i substancji testowanej zastosowane w ekspozycji indukcyjnej i prowokacyjnej oraz całkowita ilość substancji użytej do indukcji i prowokacji.

Wyniki:

— podsumowanie wyników ostatniej kontroli czułości i niezawodności (zob. 1.3) wraz z informacją dotyczącą stosowanej substancji, stężenia i nośnika,

▼B

— dotyczące każdego zwierzęcia wraz z systemem klasyfikacji,

— opisowa relacja dotycząca natury i zakresu obserwowanych skutków,

— wszelkie wyniki histopatologiczne.

Rozpatrzenie wyników.

Wnioski.

4. **BIBLIOGRAFIA**

Niniejsza metoda jest analogiczna do OECD TG 423.

▼B

Dodatek

TABELA

Skala klasyfikacji Magnusson/Kligman do oceny szkodliwych reakcji na łatę prowokacyjną

0 = brak widocznych zmian

1 = odosobniony lub niejednolity rumień

2 = umiarkowany i zlewający się rumień

3 = silny rumień i obrzęk

▼M4

B.7. 28-DNIOWE BADANIE TOKSYCZNOŚCI DOUSTNEJ WYWOŁANEJ POWTARZANYM DAWKOWANIEM U GRYZONI

WSTĘP

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna dotyczącej badań wytycznej OECD nr 407 (OECD Test Guideline 407) (2008). Pierwotną dotyczącą badań wytyczną nr 407 przyjęto w 1981 r. W 1995 r. przyjęto wersję zmienioną w celu uzyskania dodatkowych informacji na podstawie badania wykorzystanych zwierząt, w szczególności w zakresie neurotoksyczności i immunotoksyczności.

2. W 1998 r. OECD podjęła działania o najwyższym priorytecie mające na celu przejrzenie istniejących wytycznych dotyczących badań i opracowanie nowych wytycznych dla odsiewania i badania substancji potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (8). Jednym z elementów tych działań jest uzupełnienie istniejącej wytycznej OECD „Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents" („28-dniowe badanie toksyczności doustnej wywołanej powtarzanym dawkowaniem u gryzoni") (OECD TG 407) o parametry odpowiednie do wykrywania potencjału zaburzania funkcjonowania układu hormonalnego przez badane substancje chemiczne. Procedurę tę zrealizowano w ramach szeroko zakrojonego programu międzynarodowego mającego na celu zbadanie istotności i praktyczności dodatkowych parametrów, efektów zastosowania tych parametrów do substancji chemicznych o działaniu (anty)estrogenowym, działaniu (anty)androgenowym i działaniu (anty)tyroidowym, odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej i międzylaboratoryjnej oraz interferencji nowych parametrów z parametrami wymaganymi w poprzedniej wersji OECD TG 407. Uzyskaną w ten sposób dużą ilość danych opracowano i szczegółowo oceniono w kompleksowym sprawozdaniu OECD (9). Niniejsza zaktualizowana metoda badawcza B.7 (jako metoda równoważna OECD TG 407) stanowi efekt doświadczeń i wyników uzyskanych podczas międzynarodowego programu badawczego. Niniejsza metoda badawcza umożliwia umieszczenie pewnych skutków związanych z układem hormonalnym w kontekście innych skutków toksycznych.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

3. Przy szacowaniu i ocenie właściwości toksycznych substancji chemicznej oznaczenie toksyczności doustnej przy zastosowaniu powtarzanego dawkowania można prowadzić po uzyskaniu początkowej informacji o toksyczności na podstawie badań toksyczności ostrej. Niniejsza metoda badawcza ma na celu zbadanie skutków dla wielu różnych potencjalnych celów toksycznego działania. Dostarcza ona informacji dotyczących możliwych zagrożeń dla zdrowia, które mogą się pojawiać się pod wpływem wielokrotnego narażenia przez względnie ograniczony okres, w tym skutków dla układu nerwowego, immunologicznego i hormonalnego. W odniesieniu do tych punktów końcowych metoda powinna służyć do identyfikacji związków chemicznych o potencjale neurotoksycznym, co może dawać podstawy do dalszego dogłębnego badania tego aspektu, jak również związków chemicznych zakłócających fizjologię tarczycy. Metoda ta może również dostarczać danych na temat substancji chemicznych, które wpływają na męskie lub żeńskie narządy rozrodcze u młodych, dorosłych osobników zwierząt, i których działanie może wskazywać na skutki dla układu immunologicznego.

4. Wyniki badań wykonanych niniejszą metodą badawczą B.7 należy wykorzystywać do identyfikacji zagrożeń i oceny ryzyka. Wyniki uzyskane za pomocą parametrów związanych z układem hormonalnym należy rozpatrywać w kontekście dokumentu „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals" („Ramy koncepcyjne OECD dotyczące testowania i oceny substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego") (11). Metoda obejmuje podstawowe badanie toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem, które można przeprowadzić w przypadku substancji chemicznych, dla których nie ma obowiązku wykonania badania 90-dniowego (np. wtedy, gdy wielkość produkcji nie przekracza pewnych limitów) lub jako wstęp do badania długoterminowego. Czas trwania narażenia powinien wynosić 28 dni.

▼M4

5. Wyniki międzynarodowego programu walidacji parametrów odpowiednich do potencjalnego wykrywania zaburzania funkcjonowania układu hormonalnego przez badaną substancję chemiczną pokazały, że jakość danych uzyskanych za pomocą niniejszej metody badawczej B.7 zależy w dużym stopniu od doświadczenia laboratorium prowadzącego badanie. Dotyczy to w szczególności histopatologicznego określenia cyklicznych zmian w żeńskich narządach rozrodczych oraz wyznaczania masy małych, trudnych do wycięcia narządów hormonozależnych. Opracowano wytyczne dotyczące badań histopatologicznych (19). Są one dostępne na publicznej stronie internetowej OECD poświęconej wytycznym dotyczącym badań. Wytyczne mają na celu wsparcie patologów w badaniach i zwiększenie czułości oznaczenia. Znaleziono szereg różnych parametrów, które wskazują na toksyczność związaną z układem hormonalnym, i zostały one włączone do niniejszej metody badawczej. Parametry, dla których brakowało dostępnych danych mających na celu wykazanie ich użyteczności lub dla których w toku programu walidacji uzyskano jedynie słabe dowody na ich przydatność do wykrywania substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego, zaproponowano jako opcjonalne punkty końcowe (zob. dodatek 2).

6. Na podstawie danych otrzymanych w procesie walidacji należy podkreślić, że czułość tego testu jest niewystarczająca do identyfikacji wszystkich substancji o działaniu (anty)androgenowym lub (anty)estrogenowym (9). Niniejszej metody badawczej nie stosuje się na takim etapie życia, na którym występuje największa wrażliwość na zaburzanie funkcjonowania układu hormonalnego. Mimo to podczas procesu walidacji za pomocą niniejszej metody badawczej zidentyfikowano substancje, które w małym i dużym stopniu zaburzają funkcjonowanie tarczycy, jak również substancje silnie i średnio zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego poprzez receptory androgenowe i estrogenowe, jednak w większości przypadków nie udało się zidentyfikować substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego słabo wpływających na receptory estrogenowe i androgenowe. Nie można jej zatem uznać za test przesiewowy dla potencjału zaburzania funkcjonowania układu hormonalnego.

7. A zatem brak skutków związanych z tymi sposobami działania nie może być dowodem na brak działania na układ hormonalny. Nie można zatem scharakteryzować substancji w zakresie skutków związanych z układem hormonalnym tylko na podstawie wyników niniejszej metody badawczej – powinna ona być stosowana w ramach podejścia opartego na wadze dowodów, obejmującego wszystkie istniejące dane na temat substancji chemicznej, prowadzącego do scharakteryzowania potencjału zaburzania funkcjonowania układu hormonalnego. Z tego powodu decyzje regulacyjne dotyczące zaburzania funkcjonowania układu hormonalnego (charakterystyka substancji) powinny być oparte na ustaleniach wynikłych z zastosowania szerokiego podejścia, nie zaś podejmowane tylko na podstawie wyników zastosowania niniejszej metody badawczej.

8. Uznaje się, że wszystkie procedury oparte na wykorzystaniu zwierząt będą przeprowadzane zgodnie z lokalnymi normami dotyczącymi utrzymania zwierząt; opisy ich utrzymania i poddawania działaniu substancji podane poniżej stanowią standardy minimalne, a przepisy lokalne, jeśli są bardziej rygorystyczne, mają przed nimi pierwszeństwo. Dalsze wskazówki dotyczące humanitarnego traktowania zwierząt podano w dokumencie OECD (14).

9. Definicje użytych pojęć podano w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

10. Badana substancja chemiczna jest codziennie podawana doustnie w stopniowanych dawkach kilku grupom zwierząt doświadczalnych – jeden poziom dawkowania na grupę przez okres 28 dni. Podczas okresu dawkowania każdego dnia zwierzęta są dokładnie obserwowane w celu wykrycia oznak toksyczności. Zwierzęta, które padną lub zostaną poddane eutanazji w czasie trwania badania, poddawane są sekcji zwłok, a przy zakończeniu badania zwierzęta, które przeżyły, również są uśmiercane i poddawane sekcji zwłok. W 28-dniowym badaniu można uzyskać informacje na temat

▼M4

skutków powtarzanego narażenia drogą doustną i określić potrzebę przeprowadzenia dalszych badań obejmujących dłuższy okres. Można również uzyskać informacje dotyczące wyboru stężeń do badań długoterminowych. Dane otrzymane w drodze zastosowania niniejszej metody badawczej powinny umożliwić scharakteryzowanie toksyczności badanej substancji chemicznej, określenie związku dawka-odpowiedź oraz wyznaczenie poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL).

OPIS METODY

Dobór gatunków zwierząt

11. Preferowanym gatunkiem gryzonia jest szczur, choć dopuszcza się wykorzystywanie innych gatunków gryzoni. W przypadku gdy parametry określone w niniejszej metodzie badawczej B.7 badane są z wykorzystaniem innego gatunku gryzoni, należy podać uzasadnienie. Mimo że z biologicznego-punktu widzenia jest możliwe, że zwierzęta innych gatunków będą reagować na substancje toksyczne w podobny sposób do szczurów, wykorzystanie gatunków mniejszych zwierząt może spowodować zwiększenie zmienności wyników z powodu trudności technicznych z sekcją mniejszych narządów. Szczur był jedynym gatunkiem wykorzystywanym w międzynarodowym programie walidacyjnym dotyczącym substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Zaleca się wykorzystanie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt pochodzących ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. Dawkowanie powinno się rozpocząć jak najszybciej po odsadzeniu od matki, a w każdym przypadku przed ukończeniem dziewięciu tygodni. W momencie rozpoczęcia badania odchylenia mas ciała wśród wykorzystywanych zwierząt powinny być jak najniższe i nie powinny przekraczać ± 20 % średniej masy ciała u każdej z płci. Kiedy przeprowadza się badanie z zastosowaniem powtarzanego dawkowania doustnego jako badanie wstępne do badania długoterminowego, w obu badaniach należy użyć zwierząt tego samego szczepu, pochodzących z tego samego źródła.

Warunki przetrzymywania i karmienia

12. Wszystkie procedury powinny być zgodne z lokalnymi normami utrzymywania zwierząt laboratoryjnych. Temperatura w pomieszczeniu, w którym przetrzymuje się zwierzęta doświadczalne, powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Wilgotność względna, poza okresem sprzątania pomieszczenia, powinna wynosić co najmniej 30 % i raczej poniżej 70 %, należy starać się ją utrzymać na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Na wybór diety może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej przy podawaniu w ramach niniejszej metody. Zwierzęta należy przetrzymywać razem, w małych grupach składających się z osobników tej samej płci; można je przetrzymywać pojedynczo, jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia. W przypadku przetrzymywania w grupach w jednej klatce należy umieszczać nie więcej niż pięć zwierząt.

13. Paszę należy regularnie analizować pod kątem obecności zanieczyszczeń. Próbkę paszy należy zachować do momentu ukończenia sprawozdania.

Przygotowanie zwierząt

14. Zdrowe młode dorosłe osobniki zwierząt są losowo przypisane do grup kontrolnych oraz grup poddawanych działaniu substancji. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Zwierzęta są identyfikowane jednoznacznie i przetrzymywane w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem badania z poddawaniem działaniu substancji, żeby umożliwić aklimatyzację do warunków laboratoryjnych.

Przygotowanie dawek

15. Badaną substancję chemiczną podaje się za pomocą sondy bądź wraz z pokarmem lub wodą pitną. Metoda podawania drogą doustną zależy od celu badania oraz właściwości fizycznych/chemicznych/toksykokinetycznych badanej substancji chemicznej.

▼M4

16. W razie potrzeby badaną substancję chemiczną rozpuszcza się lub sporządza się jej zawiesinę w odpowiednim nośniku. Zaleca się, aby – jeżeli to możliwe – najpierw rozważyć użycie wodnego roztworu/zawiesiny, następnie roztworu/emulsji w oleju (np. oleju kukurydzianym), a dopiero potem roztworu w innych nośnikach. W przypadku nośników innych niż woda charakterystyka toksyczna nośnika musi być znana. Należy określić stabilność badanej substancji chemicznej w nośniku.

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

17. Dla każdego poziomu dawkowania należy wykorzystać co najmniej 10 zwierząt (pięć samic i pięć samców). Jeżeli planowana jest eutanazja zwierząt w trakcie trwania doświadczenia, ich liczba powinna zostać powiększona o liczbę zwierząt, które mają być poddane eutanazji przed zakończeniem badania. Należy rozważyć włączenie dodatkowej satelitarnej grupy 10 zwierząt (po 5 każdej płci) do grupy kontrolnej i grupy otrzymującej najwyższe dawki w celu obserwacji odwracalności, trwałości lub opóźnionego występowania skutków toksycznych przez co najmniej 14 dni po zakończeniu podawania substancji.

Dawkowanie

18. Zasadniczo należy wykorzystać co najmniej trzy grupy badane i grupę kontrolną, jednak jeżeli z oceny innych danych należałoby oczekiwać braku objawów przy dawce 1 000 mg/kg masy ciała/dzień, można przeprowadzić badanie graniczne. Jeżeli nie są dostępne odpowiednie dane, można wykonać badanie ustalające zakres (z wykorzystaniem zwierząt tego samego szczepu, pochodzących z tego samego źródła) w celu określenia dawek, które mają być zastosowane. Z wyjątkiem poddawania działaniu badanej substancji chemicznej, zwierzęta z grupy kontrolnej należy traktować w taki sam sposób jak zwierzęta z grup badanych. Jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej jest stosowany nośnik, grupa kontrolna powinna otrzymać największą użytą objętość nośnika.

19. Poziomy dawkowania należy dobierać przy uwzględnieniu wszelkich istniejących danych o toksyczności i danych (toksyko)kinetycznych dostępnych dla badanej substancji chemicznej lub powiązanych związków chemicznych. Należy wybrać taki najwyższy poziom dawkowania, który powoduje oznaki toksyczności, ale nie zgon lub silne cierpienie. Następnie należy dobierać poziomy dawkowania w sekwencji malejącej w taki sposób, aby ukazać wszystkie reakcje powiązane z dawkowaniem i brak obserwowanych szkodliwych zmian przy najmniejszym poziomie dawkowania (NOAEL). Często do ustalenia malejących poziomów dawkowania optymalne jest zastosowanie poziomów dawkowania różniących się od dwu- do czterokrotnie, a zamiast stosować bardzo odległe (np. różniące się więcej niż 10-krotnie) poziomy dawkowania, często lepiej jest dodać czwartą grupę badaną.

20. Jeśli obserwowana jest ogólna toksyczność (np. zmniejszenie masy ciała, wpływ na wątrobę, serce, płuca lub nere iitp.) bądź inne zmiany, które nie muszą być efektami toksycznymi (np. zmniejszone pobieranie pokarmu, powiększenie wątroby), interpretacji obserwowanych skutków dla punktów końcowych w postaci wpływu na układ immunologiczny, neurologiczny lub hormonalny należy dokonywać ostrożnie.

Badanie graniczne

21. Jeżeli badanie przy jednym poziomie dawkowania równym co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała/dzień lub, w przypadku podawania w pożywieniu lub wodzie pitnej, równoważnemu procentowi w pożywieniu lub wodzie pitnej (określonemu na podstawie masy ciała), przy zastosowaniu procedur opisanych dla tego badania, nie wywołuje widocznych oznak toksyczności i jeżeli na podstawie danych dotyczących strukturalnie powiązanych związków nie należałoby spodziewać się toksyczności, pełne badanie przy użyciu trzech poziomów dawkowania może nie być konieczne. Takie badanie graniczne stosuje się z wyjątkiem przypadków, w których narażenie ludzi wskazuje na konieczność użycia wyższego poziomu dawkowania.

▼M4

Podawanie dawek

22. Zwierzętom podaje się badaną substancję chemiczną codziennie, siedem dni w tygodniu przez okres 28 dni. Gdy badana substancja chemiczna jest podawana przez sondę, należy ją podawać zwierzętom w pojedynczej dawce przy użyciu sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Maksymalna objętość cieczy, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można zastosować 2 ml/100 g masy ciała. Z wyjątkiem drażniących i żrących substancji chemicznych, dla których zazwyczaj przy wyższych stężeniach występują zaostrzone objawy, należy zminimalizować zmienność objętości substancji badanej przez dostosowanie stężenia tak, aby przy wszystkich poziomach dawkowania objętość była stała.

23. W przypadku substancji chemicznych podawanych w pokarmie lub wodzie pitnej ważne jest dopilnowanie, aby takie ilości badanej substancji chemicznej nie zakłócały normalnego odżywiania ani bilansu wodnego organizmu. Przy podawaniu badanej substancji chemicznej wraz z pokarmem można zastosować stałe stężenie w pokarmie (ppm) lub też stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia; trzeba podać zastosowany wariant. W przypadku podawania substancji chemicznej przez sondę dawkę należy podawać każdego dnia o zbliżonej porze i w razie konieczności modyfikować, aby utrzymać stały poziom dawkowania w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia. W przypadku gdy badanie z powtarzanym dawkowaniem jest przeprowadzane jako badanie wstępne do badania długoterminowego, należy w obu badaniach stosować podobną dietę.

Obserwacje

24. Okres obserwacji powinien wynosić 28 dni. Zwierzęta z grupy satelitarnej przeznaczone do obserwacji uzupełniających należy trzymać co najmniej 14 dni bez podawania substancji w celu wykrycia opóźnionego pojawienia się, utrzymywania lub ustąpienia oznak toksyczności.

25. Ogólne obserwacje kliniczne należy przeprowadzać co najmniej raz dziennie, najlepiej o tej samej porze każdego dnia, biorąc pod uwagę szczytowy okres występowania przewidywanych objawów po dawkowaniu. Należy rejestrować stan zdrowia zwierząt. Co najmniej dwa razy dziennie wszystkie zwierzęta poddaje się obserwacjom pod kątem zachorowalności i śmiertelności.

26. Dla wszystkich zwierząt należy przeprowadzać szczegółowe obserwacje kliniczne: jeden raz przed pierwszym narażeniem (w celu umożliwienia porównania badanych zwierząt), a następnie co najmniej raz w tygodniu. Obserwacji należy dokonywać poza klatką zwierzęcia, najlepiej w warunkach standardowych i za każdym razem o tej samej porze. Obserwacje należy starannie odnotowywać, najlepiej za pomocą systemów punktacji wyraźnie określonych przez laboratorium badawcze. Należy dołożyć starań w celu dopilnowania, aby odchylenia w warunkach badania były minimalne, preferowane jest prowadzenie obserwacji przez osoby, które nie wiedzą, jaka substancja jest podawana. Odnotowane objawy powinny obejmować między innymi zmiany w skórze, futrze, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin i wydalin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego (np. łzawienie, piloerekcję, rozmiar źrenicy, nietypowy rytm oddychania). Należy odnotować także zmiany w sposobie chodzenia, postawie i reakcji na dotyk, jak również obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, zachowań stereotypowych (np. nadmierne czyszczenie się, powtarzające się krążenie w kółko) oraz dziwnych zachowań (np. samookaleczanie się, chodzenie do tyłu) (2).

27. W czwartym tygodniu narażenia należy przeprowadzić ocenę reaktywności sensorycznej na różnego typu bodźce (2) (np. bodźce słuchowe, wzrokowe i proprioceptywne) (3) (4) (5), ocenę siły uchwytu (6) i aktywności motorycznej (7). Dalsze szczegółowe informacje na temat procedur, jakie można zastosować, podano w odnośnych źródłach literaturowych. Można jednak zastosować również procedury inne niż te podane w bibliografii.

▼M4

28. Obserwacje czynnościowe przeprowadzane w czwartym tygodniu narażenia można pominąć, gdy badanie prowadzone jest jako badanie wstępne do późniejszego (90-dniowego) badania toksyczności podprzewlekłej. W takim przypadku obserwacje czynnościowe należy zamieścić w tym badaniu uzupełniającym. Z drugiej strony, dostępność danych dotyczących obserwacji czynnościowych z badania z powtarzanym dawkowaniem może zwiększyć możliwości doboru poziomów dawkowania do celów późniejszego badania toksyczności podprzewlekłej.

29. Wyjątkowo można pominąć obserwacje czynnościowe również w odniesieniu do grup, które oprócz tego przejawiają oznaki toksyczności nasilone na tyle, że mogłyby znacznie zakłócić wykonanie badania czynnościowego.

30. Podczas sekcji zwłok można (opcjonalnie) określić cykl estrogenowy wszystkich samic za pomocą rozmazów śluzówki pochwy. Z tych obserwacji uzyskuje się informacje dotyczące etapu cyklu estrogenoweo w momencie uśmiercenia zwierzęcia oraz dane do oceny histologicznej tkanek wrażliwych na działanie estrogenów [zob. wytyczne dotyczące histopatologii (19)].

Masa ciała i spożycie pokarmu/wody

31. Wszystkie zwierzęta należy ważyć przynajmniej raz na tydzień. Pomiarów spożycia pokarmu należy dokonywać nie rzadziej niż co tydzień. Jeśli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie pitnej, należy mierzyć również spożycie wody, nie rzadziej niż raz w tygodniu.

Hematologia

32. Pod koniec okresu badania należy przeprowadzić następujące analizy hematologiczne: hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczba erytrocytów, liczba retikulocytów, całkowita i różnicowa liczba leukocytów, liczba płytek krwi i pomiar czasu krzepnięcia krwi. Jeśli badana substancja chemiczna lub jej potencjalne metabolity mają właściwości utleniające lub podejrzewa się, że mogą mieć takie właściwości, należy również przeprowadzić inne oznaczenia, w tym stężenia methemoglobiny i ciałek Heinza.

33. Próbki krwi należy pobierać z wyznaczonego miejsca tuż przed eutanazją zwierząt lub jako element jej procedury, i przechowywać w odpowiednich warunkach. Zwierzęta w noc przed eutanazją nie powinny otrzymywać pokarmu ([1]).

Biochemia kliniczna

34. Oznaczenia parametrów biochemii klinicznej w celu zbadania głównych skutków toksycznych w tkankach, a w szczególności skutków dla nerek i wątroby, należy wykonać na próbkach krwi pobranych od każdego zwierzęcia tuż przed eutanazją lub jako element jej procedury (z wyjątkiem zwierząt, które przed zakończeniem badania znalazły się w stanie agonalnym lub zostały uśmiercone). Badania osocza i surowicy muszą obejmować oznaczenia sodu, potasu, glukozy, cholesterolu całkowitego, mocznika, kreatyniny, całkowitego białka i albuminy, co najmniej dwóch enzymów wskazujących na stan komórek wątroby (takich jak aminotransferaza alaninowa, aminotransferaza asparaginianowa, fosfataza alkaliczna, transpeptydaza gammaglutamylowa i dehydrogenaza glutaminianowa) oraz kwasów żółciowych. W pewnych okolicznościach przydatnych informacji mogą dostarczyć pomiary dodatkowych enzymów (pochodzenia wątrobowego lub innego) oraz bilirubiny.

35. Opcjonalnie można w ciągu ostatniego tygodnia badań przeprowadzić następujące oznaczenia analityczne w moczu przy użyciu zebranej w określonym czasie objętości moczu: wygląd, objętość, osmolalność lub masa właściwa, pH, białko, glukoza i krew/komórki krwi.

([1]) W odniesieniu do niektórych pomiarów dotyczących surowicy i osocza, w szczególności dla glukozy, zaleca się wstrzymanie podawania pokarmu przez noc. Zalecenie to wynika głównie z faktu, że zwiększona zmienność, którą nieuchronnie powoduje brak wstrzymania podawania pokarmu, często maskuje bardziej subtelne skutki, co utrudnia interpretację wyników. Z drugiej strony jednak wstrzymanie podawania pokarmu przez noc może wpływać na ogólny metabolizm zwierząt i w szczególności w badaniach żywieniowych może zakłócać dzienne narażenie na działanie badanej substancji chemicznej. Jeżeli przyjęte jest wstrzymanie podawania pożywienia przez całą noc, biochemiczne oznaczenia kliniczne należy wykonać po przeprowadzeniu obserwacji czynnościowych w czwartym tygodniu badania.

▼M4

36. Ponadto należy rozważyć zastosowanie do badań osocza lub surowicy znaczników ogólnego uszkodzenia tkanek. Inne oznaczenia, które należy wykonać, jeżeli znane właściwości badanej substancji chemicznej mogą wpływać na pokrewne profile metaboliczne lub podejrzewa się taki wpływ, obejmują oznaczenia wapnia, fosforanów, trójglicerydów, poszczególnych hormonów i pseudocholinesterazy. Należy je określić dla substancji chemicznych należących do niektórych klas lub indywidualnie w każdym przypadku.

37. Mimo że w toku międzynarodowej oceny punktów końcowych związanych z układem hormonalnym nie wykazano oczywistych zalet oznaczania hormonów tarczycy (T_3, T_4) i TSH, użyteczne może być zachowanie próbek osocza lub surowicy w celu zmierzenia poziomów T_3, T_4 i TSH (opcjonalnie), jeżeli istnieją przypuszczenia co do skutków dla osi przysadkowo-tarczycowej. Próbki te można przechowywać w stanie zamrożonym, w temperaturze -20 °C. Na zmienność i wartości bezwzględne stężeń przy oznaczaniu hormonów mogą mieć wpływ następujące czynniki:

— czas uśmiercenia zwierzęcia w związku z dobową zmiennością stężeń hormonów,

— metoda uśmiercenia zastosowana w celu uniknięcia zbędnego stresu dla zwierząt mogącego wpłynąć na stężenia hormonów,

— zestawy do oznaczania hormonów, których krzywe standardowe mogą się różnić.

Wyniki identyfikacji substancji chemicznych działających na tarczycę uzyskane na podstawie analizy histopatologicznej są bardziej wiarygodne niż identyfikacja na podstawie poziomów hormonów.

38. Próbki osocza przeznaczone konkretnie do oznaczenia poziomu hormonów należy pobierać o porównywalnej porze dnia. Zaleca się, aby na podstawie zmian histopatologicznych w tarczycy rozważyć oznaczenie T_3, T_4 i TSH. Wartości liczbowe uzyskane w toku analizy stężeń hormonów różnią się w zależności od zastosowanego dostępnego w handlu zestawu testowego. Uzyskanie kryteriów w oparciu o jednorodne dane historyczne może zatem być niemożliwe. Alternatywnie laboratoria powinny dążyć do utrzymywania kontrolnych współczynników zmienności poniżej 25 w odniesieniu do T_3 i T_4, a w odniesieniu do TSH – poniżej 35. Wszystkie stężenia zapisuje się w ng/ml.

39. Jeżeli historyczne dane odniesienia są niewystarczające, należy rozważyć oznaczenie zmiennych hematologicznych i biochemii klinicznej przed rozpoczęciem podawania dawek lub, lepiej, w grupie zwierząt niebędących zwierzętami doświadczalnymi.

PATOLOGIA

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

40. Wszystkie zwierzęta w badaniu podlegają szczegółowemu pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu, które obejmuje staranne badanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszystkich otworów ciała, jamy czaszkowej, klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Wątroba, nerki, nadnercza, jądra, najądrza, prostata + pęcherzyki nasienne wraz z gruczołami koagulującymi jako całość, grasica, śledziona, mózg i serce wszystkich zwierząt (z wyjątkiem tych, które przed zakończeniem badania znalazły się w stanie agonalnym lub zostały uśmiercone) powinny być odpowiednio okrojone z wszelkich przylegających tkanek i należy niezwłocznie po sekcji zmierzyć ich mokrą masę w celu zapobieżenia wyschnięciu. Należy zachować ostrożność przy okrajaniu zespołu prostaty, aby uniknąć przebicia wypełnionych płynem pęcherzyków nasiennych. Alternatywnie można okroić i zważyć pęcherzyki nasienne i prostatę po utrwaleniu.

▼M4

41. Ponadto opcjonalnie można zważyć kolejne dwa zespoły tkanek niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji w celu uniknięcia wyschnięcia: parę jajników (mokra masa) i macicę wraz z szyjką (wytyczne w zakresie wycinania i przygotowania tkanek macicy w celu pomiaru masy podane są w OECD TG 440 (18)).

42. Masę tarczycy można (opcjonalnie) określić po utrwaleniu. Należy zachować dużą ostrożność przy okrawaniu i wykonywać je dopiero po utrwaleniu, w celu uniknięcia uszkodzenia tkanek. Mogłoby ono zakłócić analizę histopatologiczną.

43. Następujące tkanki należy zachować w roztworze utrwalającym najbardziej odpowiednim zarówno dla rodzaju tkanki, jak i planowanego późniejszego badania histopatologicznego (zob. punkt 47): wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne, mózg (reprezentatywne regiony, w tym kresomózgowie, móżdżek i most), rdzeń kręgowy, oko, żołądek, jelito cienkie i grube (w tym kępki Peyera), wątrobę, nerki, nadnercza, śledzionę, serce, grasicę, tarczycę, tchawicę i płuca (zakonserwowane przez napełnienie środkiem utrwalającym i następnie zanurzenie), gonady (jądra i jajniki), płciowe narządy dodatkowe (macicę i szyjkę macicy, najądrza, prostatę + pęcherzyki nasienne wraz z gruczołami koagulującymi), pochwę, pęcherz moczowy, węzły chłonne [poza najbliższym węzłem chłonnym należy pobrać inny węzeł w zależności od doświadczenia laboratorium (15)], nerw obwodowy (kulszowy lub piszczelowy), najlepiej w bliskiej odległości od mięśnia, mięsień szkieletowy i kość szkieletową wraz ze szpikiem kostnym (wycinek lub ewentualnie świeżo pobrany szpik kostny). Zaleca się utrwalenie jąder poprzez zanurzenie w utrwalaczu Bouina lub zmodyfikowanym utrwalaczu Davidsona (16) (17). Błonę białawą trzeba delikatnie i płytko przekłuć igłą na obu biegunach narządu w celu umożliwienia szybkiego przeniknięcia płynu utrwalającego do utrwalacza. Wyniki badań klinicznych i innych testów mogą wskazać na konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Organy uznane w oparciu o znane właściwości badanej substancji chemicznej za prawdopodobne organy docelowe także należy zachować.

44. Ważnych wskazówek co do efektów związanych z układem hormonalnym mogą dostarczyć badania następujących tkanek: gonad (jajników i jąder), płciowych narządów dodatkowych (macicy wraz z szyjką, najądrzy, pęcherzyków nasiennych z gruczołami koagulacyjnymi, części grzbietowo-bocznej i brzusznej prostaty), pochwy, przysadki mózgowej, męskich gruczołów mlekowych, tarczycy i gruczołu nadnerczowego. Zmiany w męskich gruczołach mlekowych nie są zbyt dobrze udokumentowane, ale parametr ten może być bardzo czuły na substancje o działaniu estrogenowym. Badania organów/tkanek niewymienionych w pkt 43 są opcjonalne (zob. dodatek 2).

45. W wytycznych dotyczących histopatologii (19) podano dodatkowe informacje dotyczące wycinania, utrwalania, dzielenia i histopatologii tkanek układu hormonalnego.

46. W międzynarodowym programie badawczym uzyskano dowody na to, że nieznaczne skutki działania na układ hormonalny substancji chemicznych o niewielkiej sile działania na homeostazę hormonów płciowych można wykryć poprzez zakłócenie synchronizacji cyklu estrogenowego w różnych tkankach, nie zaś poprzez bezpośrednie zmiany histopatologiczne w żeńskich organach płciowych. Mimo że definitywne dowody na takie oddziaływanie nie są znane, zaleca się uwzględnienie dowodów na możliwą desynchronizację cyklu estrogenowego w interpretacji badań histopatologicznych jajników (komórek pęcherzykowych, osłonkowych i warstwy ziarnistej pęcherzyka Graffa), macicy, szyjki macicy oraz pochwy. W porównaniu tym można uwzględnić również etap cyklu estrogenowego określony na podstawie rozmazów śluzówki pochwy, o ile wykonano taką ocenę.

▼M4

Histopatologia

47. Pełne badanie histopatologiczne należy przeprowadzić na zakonserwowanych narządach i tkankach wszystkich zwierząt z grupy kontrolnej i grupy otrzymującej najwyższe dawki. Badania te powinny być rozciągnięte na wszystkie inne grupy badane, jeśli w grupie otrzymującej najwyższe dawki obserwuje się zmiany związane z działaniem substancji.

48. Wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne muszą być zbadane.

49. Jeśli wykorzystuje się grupę satelitarną, należy przeprowadzić badanie histopatologiczne tych tkanek i organów, w których – w grupach otrzymujących substancję badaną – stwierdzono skutki podania substancji.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

50. Należy przedstawić dane dotyczące poszczególnych zwierząt. Ponadto wszystkie dane należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt padłych w trakcie trwania badania lub poddanych eutanazji z przyczyn humanitarnych wraz z określeniem czasu zgonu lub eutanazji, liczbę zwierząt wykazujących oznaki toksyczności, opis obserwowanych oznak toksyczności, w tym czas ich pojawienia się, czas trwania, nasilenie wszelkich skutków toksycznych, liczbę zwierząt wykazujących zmiany patologiczne, typ takich zmian, ich nasilenie oraz procent zwierząt wykazujących każdy typ zmiany.

51. O ile to możliwe, wyniki liczbowe należy poddawać ocenie za pomocą właściwych i ogólnie przyjętych metod statystycznych. Przy porównywaniu skutków dla różnych dawek należy unikać stosowania wielokrotnego porównywania testem t-Studenta. Metody statystyczne należy wybrać podczas planowania badania.

52. Proponuje się, aby do celów kontroli jakości zbierać historyczne dane kontrolne i obliczać współczynniki zmienności dla danych liczbowych, szczególnie w odniesieniu do parametrów związanych z wykrywaniem substancji zakłócających funkcjonowanie układu hormonalnego. Dane te można wykorzystać do celów porównawczych przy ocenie bieżących badań.

Sprawozdanie z badania

53. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— cechy fizyczne, czystość i własności fizykochemiczne,

— dane identyfikacyjne.

Nośnik (w stosownych przypadkach)

— uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda).

Zwierzęta badane

— wykorzystany gatunek/szczep,

— liczba, wiek i płeć zwierząt,

— źródło, warunki przebywania, pokarm itp.,

— masa ciała poszczególnych zwierząt na początku badania,

— uzasadnienie wyboru gatunku, jeśli jest inny niż szczur.

Warunki badania

— uzasadnienie wyboru poziomu dawek,

— szczegóły dotyczące postaci użytkowej badanej substancji chemicznej/przygotowania pokarmu, osiągnięte stężenie, stabilność i jednorodność preparatu,

▼**M4**

— szczegóły dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,

— wskaźnik konwersji stężenia badanej substancji chemicznej w pokarmie/wodzie pitnej (ppm) do dawki rzeczywistej (mg/kg masy ciała/dzień), jeśli ma to zastosowanie,

— szczegółowe informacje na temat jakości pokarmu i wody.

Opcjonalne badane punkty końcowe

— lista opcjonalnych badanych punktów końcowych.

Wyniki

— masa ciała/zmiany masy ciała,

— dane dotyczące spożycia pokarmu oraz wody, w stosownych przypadkach,

— dane dotyczące efektu toksycznego według płci i poziomu dawki, w tym oznaki toksyczności,

— rodzaj, nasilenie i czas trwania obserwowanych objawów klinicznych (tak odwracalnych, jak i nieodwracalnych),

— oceny aktywności sensorycznej, siły uchwytu i aktywności motorycznej,

— badania hematologiczne wraz z odpowiednimi wartościami odniesienia,

— badania biochemii klinicznej wraz z odpowiednimi wartościami odniesienia,

— masa ciała w momencie eutanazji oraz dane dotyczące masy organów,

— wyniki sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników badań histopatologicznych,

— dane dotyczące wchłaniania, jeśli są dostępne,

— w stosownych przypadkach statystyczne opracowanie wyników.

Omówienie wyników.

Wnioski.

▼M4

Dodatek 1

DEFINICJE

Działanie androgenowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu androgenowego (np. testosteronu) w organizmach ssaków.

Działanie antyandrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu androgenowego (np. testosteronu) w organizmach ssaków.

Działanie antyestrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu estrogenowego (np. 17ß-estradiolu) w organizmach ssaków.

Działanie antytyroidowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu tarczycy (np. T_3) w organizmach ssaków.

Dawkowanie jest to określenie ogólne obejmujące wysokość dawki, częstotliwość jej podawania i czas trwania podawania substancji.

Dawka jest to ilość podawanej badanej substancji chemicznej. Dawkę wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej na jednostkę masy ciała zwierzęcia doświadczalnego na dzień (np. mg/kg masy ciała/dzień) lub jako stałe stężenie w diecie.

Wyraźna toksyczność jest to określenie ogólne opisujące wyraźne oznaki toksyczności występujące po podaniu badanej substancji chemicznej. Powinny one być wystarczające do oceny ryzyka i takie, że można oczekiwać, iż zwiększenie podawanej dawki spowoduje pojawienie się silnych oznak toksyczności i prawdopodobną śmiertelność.

NOAEL jest to skrót oznaczający poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian. Jest to najwyższy poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych efektów związanych z podawaniem substancji na skutek jej podawania.

Działanie estrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu estrogenowego (np. 17ß-estradiolu) w organizmach ssaków.

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Działanie tyroidowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu tarczycy (np. T_3) w organizmach ssaków.

Walidacja jest to proces naukowy mający na celu scharakteryzowanie wymogów operacyjnych i ograniczeń metody badawczej i wykazanie jej wiarygodności oraz odpowiedniości do danego celu.

▼M4

Dodatek 2

Punkty końcowe zalecane do wykrywania substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego w niniejszej metodzie badawczej B.7

Obowiązkowe punkty końcowe	Opcjonalne punkty końcowe
Masa	
— Jądra	— Jajniki
— Najądrza	— Macica wraz z szyjką
— Nadnercza	— Tarczyca
— Prostata + pęcherzyki nasienne wraz z gruczołami koagulującymi	
Histopatologia	
— Gonady:	— Rozmazy śluzówki pochwy
— Jądra oraz	— Męskie gruczoły mlekowe
— Jajniki	— Przysadka mózgowa
— Płciowe narządy dodatkowe:	
— Najądrza,	
— Prostata + pęcherzyk nasienny wraz z gruczołami koagulującymi	
— Macica wraz z szyjką	
— Nadnercze	
— Tarczyca	
— Pochwa	
Pomiar poziomu hormonów	
	— Poziomy T_3 i T_4 we krwi
	— Poziomy TSH we krwi

BIBLIOGRAFIA:

(1) OECD (Paryż, 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 nr 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 nr 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 nr 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 nr 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, ss. 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. **TOKSYCZNOŚĆ PODOSTRA – NARAŻENIE INHALACYJNE: BADANIE 28-DNIOWE**

STRESZCZENIE

Niniejszą zmienioną metodę badawczą B.8 opracowano w celu otrzymania pełnej charakterystyki toksyczności badanej substancji chemicznej wskutek narażenia inhalacyjnego po powtarzanym narażeniu przez ograniczony okres (28 dni) oraz uzyskania danych na potrzeby ilościowych ocen ryzyka dotyczącego narażenia inhalacyjnego. Grupy co najmniej 5 samców i 5 samic gryzoni są w ciągu 28 dni przez 6 godzin dziennie narażane na działanie: a) badanej substancji chemicznej przy co najmniej trzech poziomach stężenia; b) powietrza filtrowanego (ujemna grupa kontrolna); lub c) nośnika (grupa kontrolna nośnika). Na ogół zwierzęta narażane są na działanie substancji przez 5 dni w tygodniu, ale narażenie przez 7 dni w tygodniu również jest dozwolone. Zawsze bada się samce i samice, lecz jeśli wiadomo, że jedna płeć jest bardziej podatna na daną badaną substancję chemiczną, zwierzęta różnych płci mogą być poddane narażeniu przy różnych poziomach stężenia. Metoda ta pozwala kierownikowi badania na elastyczność, jeżeli chodzi o włączenie do badania grup satelitarnych (badania odwracalności), płukania oskrzelowo-pęcherzykowego, testów neurologicznych oraz dodatkowych badań z zakresu patologii klinicznej i histopatologicznych w celu lepszego scharakteryzowania toksyczności badanej substancji chemicznej.

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 412 (OECD TG 412) (2009). Pierwotną dotyczącą badań podostrej toksyczności inhalacyjnej wytyczną nr 412 (TG 412) przyjęto w 1981 r. (1). Niniejsza metoda badawcza B.8 (równoważna zmienionej wytycznej TG 412) została zaktualizowana w celu odzwierciedlenia stanu wiedzy naukowej oraz zaspokojenia obecnych i przyszłych potrzeb regulacyjnych.

2. Niniejsza metoda umożliwia scharakteryzowanie szkodliwych zmian w następstwie powtarzanego codziennego narażenia inhalacyjnego na działanie badanej substancji chemicznej przez 28 dni. Dane pochodzące z 28-dniowych badań podostrej toksyczności inhalacyjnej mogą być wykorzystywane do ilościowych ocen ryzyka [o ile nie zostanie następnie przeprowadzone 90-dniowe badanie toksyczności podprzewlekłej wskutek narażenia inhalacyjnego (rozdział B.29 niniejszego załącznika)]. Z danych tych można również uzyskać informacje dotyczące doboru stężeń do badań dłuższych, takich jak 90-dniowe badanie podprzewlekłej toksyczności inhalacyjnej. Niniejsza metoda badawcza nie jest przeznaczona do badania nanomateriałów. Definicje stosowane w kontekście niniejszej metody badawczej znajdują się na końcu tego rozdziału i w wytycznych (GD) nr 39 (2).

WSTĘPNE ROZWAŻANIA

3. Przed przeprowadzeniem badania laboratorium badawcze powinno wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej w celu poprawienia jakości badania oraz zminimalizowania wykorzystania zwierząt. Informacje, które będą pomocne w wyborze odpowiednich badanych stężeń, mogą obejmować nazwę chemiczną, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*; przewidywane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR i dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie powiązanych związków oraz dane pochodzące z badań ostrej toksyczności inhalacyjnej. Jeżeli w trakcie badania oczekiwana lub obserwowana jest neurotoksyczność, kierownik badania może zdecydować o włączeniu do badania odpowiednich ocen, takich jak zestaw badań czynnościowych i obserwacyjnych i pomiar aktywności motorycznej. Mimo że w przypadku określonych badań decydujące znaczenie może mieć termin narażenia na działanie substancji, przeprowadzanie tych dodatkowych czynności nie powinno kolidować z podstawowym projektem badania.

▼M4

4. Rozcieńczenia badanych substancji chemicznych mających działanie żrące lub drażniące można badać przy stężeniach, które dadzą pożądany stopień toksyczności [zob. GD 39 (2)]. Podczas narażania zwierząt na działanie tych substancji stężenia docelowe powinny być na tyle niskie, aby nie powodować silnego bólu i stresu, a zarazem wystarczające do przedłużenia krzywej stężenie-odpowiedź do poziomów, które pozwalają osiągnąć regulacyjny i naukowy cel badania. Stężenia te należy wybierać indywidualnie dla każdego przypadku, najlepiej w oparciu o odpowiednio zaprojektowane badanie ustalające zakres, które dostarcza informacji na temat krytycznego punktu końcowego, wszelkich progów powodujących działanie drażniące oraz czasu pojawienia się objawów (zob. pkt 11–13). Należy podać uzasadnienie wyboru stężenia.

5. Zwierzęta w stanie agonalnym oraz zwierzęta wykazujące oczywiste oznaki bólu czy objawy ostrego i przewlekłego stresu powinny zostać uśmiercone w sposób humanitarny. Zwierzęta w stanie agonalnym traktuje się tak samo jak zwierzęta padłe w trakcie badania. Kryteria podejmowania decyzji co do uśmiercenia zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących silny ból oraz wytyczne dotyczące rozpoznawania prognozowanego lub nieuchronnie zbliżającego się zgonu są zawarte w wytycznych OECD dotyczących humanitarnego punktu końcowego (3).

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

6. Należy wykorzystać powszechnie stosowane laboratoryjne szczepy zdrowych, młodych, dorosłych gryzoni. Preferowanym gatunkiem jest szczur. Jeżeli wykorzystuje się inny gatunek, należy podać uzasadnienie.

Przygotowanie zwierząt

7. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. W dniu randomizacji zwierzęta powinny być młodymi dorosłymi osobnikami w wieku od 7 do 9 tygodni. Masa ciała powinna mieścić się w granicach ± 20 % średniej masa dla każdej płci. Zwierzęta są wybierane losowo, oznaczane w sposób umożliwiający identyfikację poszczególnych osobników i przetrzymywane w klatkach przynajmniej przez 5 dni przed rozpoczęciem badania, żeby umożliwić aklimatyzację do warunków laboratoryjnych.

Hodowla zwierząt

8. W celu ułatwienia obserwacji i uniknięcia pomyłek zwierzęta powinny być indywidualnie oznakowane przy pomocy, o ile to możliwe, podskórnych transponderów. Temperatura w pomieszczeniach, w których przetrzymuje się zwierzęta doświadczalne, powinna wynosić 22 ± 3 °C. Najlepiej byłoby, gdyby wilgotność względna była utrzymywana w przedziale 30–70 %, chociaż może to być niemożliwe w przypadku stosowania wody jako nośnika. Przed narażeniem i po nim zwierzęta na ogół należy trzymać w klatkach w grupach podzielonych według płci i badanego stężenia, lecz liczba zwierząt w klatce nie powinna przeszkadzać w dokładnej obserwacji każdego zwierzęcia, a także powinna umożliwiać zminimalizowanie strat w zwierzętach spowodowanych kanibalizmem i walkami. Jeżeli zwierzęta mają być poddane narażeniu tylko przez nos, konieczne może być przyzwyczajenie ich do rur unieruchamiających. Rury unieruchamiające nie powinny powodować u zwierząt nadmiernego stresu fizycznego, termicznego czy związanego z unieruchomieniem. Unieruchomienie może wpłynąć na fizjologiczne punkty końcowe, takie jak temperatura ciała (hipertermia) lub minutowa pojemność oddechowa. Jeżeli dostępne są dane ogólne, na podstawie których można wykazać, że takie zmiany nie występują w znaczącym stopniu, uprzednia adaptacja do rur unieruchamiających nie jest konieczna. Zwierzęta, których cała powierzchnia ciała jest narażana na działanie aerozolu, w trakcie narażenia powinny być trzymane oddzielnie, aby zapobiec filtrowaniu badanego aerozolu przez futro innych zwierząt w tej samej klatce. Można stosować konwencjonalne oraz certyfikowane pasze laboratoryjne, z wyjątkiem okresów poddawania narażeniu, należy także zapewnić nieograniczony dostęp do wody pitnej z miejscowej instalacji wodociągowej. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności.

▼M4

Komory inhalacyjne

9. Przy wyborze komory inhalacyjnej należy wziąć pod uwagę charakter badanej substancji chemicznej i przedmiot badania. Preferowaną drogą narażenia jest narażenie tylko przez nos (pojęcie to obejmuje narażenie tylko głowy, narażenie tylko przez nos lub narażenie tylko pyska). Narażenie tylko przez nos jest na ogół preferowane w badaniach aerozoli ciekłych lub stałych oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole. Narażenie całego ciała może lepiej sprzyjać osiągnięciu szczególnych celów badania, taki wybór należy jednak uzasadnić w sprawozdaniu z badania. Aby zagwarantować stabilność atmosfery przy zastosowaniu komory do poddawania narażeniu całego ciała, całkowita „objętość" badanych zwierząt nie powinna przekraczać 5 % objętości komory. Zasady technik narażenia tylko przez nos i przez powierzchnię całego ciała oraz ich szczególne zalety i wady omówiono w GD 39 (2).

BADANIA TOKSYCZNOŚCI

Stężenia graniczne

10. W przeciwieństwie do badań toksyczności ostrej w 28-dniowych badaniach podostrej toksyczności inhalacyjnej nie ma określonych stężeń granicznych. Przy wyborze maksymalnego badanego stężenia należy uwzględnić: 1) maksymalne stężenie możliwe do uzyskania; 2) poziom narażenia ludzi w najgorszym przypadku; 3) konieczność utrzymania wystarczającej podaży tlenu; lub 4) troskę o dobrostan zwierząt. W przypadku braku wartości granicznych opartych na danych można stosować granice toksyczności ostrej określone w rozporządzeniu (WE) nr 1272/2008 (13) (tj. do maksymalnego stężenia 5 mg/l dla aerozoli, 20 mg/l dla par i 20 000 ppm dla gazów); zob. GD 39 (2). Jeżeli podczas badania gazów lub wysoce lotnych badanych substancji chemicznych (np. czynników chłodniczych) konieczne jest przekroczenie tych granic, należy podać uzasadnienie. Stężenie graniczne powinno wywoływać wyraźną toksyczność bez powodowania zbędnego stresu dla zwierząt ani wpływania na długość ich życia (3).

Badanie ustalające zakres

11. Przed rozpoczęciem badania głównego może być konieczne przeprowadzenie badania ustalającego zakres. Badanie ustalające zakres jest bardziej rozległe niż badanie rozpoznawcze, ponieważ nie jest ograniczone do wyboru stężenia. Wiedza zdobyta poprzez badanie ustalające zakres może doprowadzić do powodzenia badania głównego. Badanie ustalające zakres może na przykład dostarczać informacji technicznych na temat metod analitycznych, klasyfikacji cząstek według wielkości, odkrycia mechanizmów toksycznych, danych z zakresu patologii klinicznej i histopatologicznych oraz oszacowań NOAEL i MTC (ang. *maximum tolerable concentration* – maksymalne tolerowane stężenie) w badaniu głównym. Kierownik badania może postanowić wykorzystać badanie ustalające zakres do określenia progu działania drażniącego na drogi oddechowe (np. przy pomocy histopatologii dróg oddechowych, badania czynności płuc lub płukania oskrzelowo-pęcherzykowego), górnego poziomu stężenia, który jest tolerowany bez zbędnego stresu dla zwierząt, oraz parametrów, które najlepiej scharakteryzują toksyczność badanej substancji chemicznej.

12. Badanie ustalające zakres może obejmować jeden poziom stężenia lub większą ich liczbę. Na działanie każdego stężenia należy narażać nie więcej niż trzech samców i trzy samice. Badanie ustalające zakres powinno trwać co najmniej 5 dni i zazwyczaj nie więcej niż 14 dni. Uzasadnienie wyboru stężeń na potrzeby badania głównego należy podać w sprawozdaniu z badania. Celem badania głównego jest wykazanie zależności stężenie-odpowiedź w oparciu o przewidywany najczulszy punkt końcowy. Najlepiej byłoby, gdyby najniższe stężenie było stężeniem, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, natomiast najwyższe stężenie powinno wywoływać wyraźną toksyczność bez powodowania zbędnego stresu dla zwierząt ani wpływania na długość ich życia (3).

▼M4

13. Przy wyborze poziomów stężenia na potrzeby badania ustalającego zakres należy wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje, w tym zależności struktura-aktywność i dane dotyczące podobnych chemikaliów (zob. pkt 3). W ramach badania ustalającego zakres można zweryfikować/obalić punkty końcowe, które uważa się za najczulsze oparte na mechanistycznym modelu punkty, np. inhibicję pseudocholinesterazy przez związki fosforoorganiczne, tworzenie methemoglobiny przez związki toksyczne dla erytrocytów, hormony tarczycy (T_3, T_4) w odniesieniu do związków tyreotoksycznych, białka, LDH lub neutrofile w płukaniu oskrzelowo-pęcherzykowym w odniesieniu do nieszkodliwych słabo rozpuszczalnych cząstek lub aerozoli mających działanie drażniące na płuca.

Badanie główne

14. Główne badanie toksyczności podostrej na ogół obejmuje trzy poziomy stężenia, a także w razie potrzeby równoległe ujemne (poddane działaniu powietrza) grupy kontrolne lub grupy kontrolne nośnika (zob. pkt 17). Jako pomoc w wyborze odpowiednich poziomów narażenia należy wykorzystać wszystkie dostępne dane, w tym wyniki badań toksyczności ogólnoustrojowej, metabolizmu i kinetyki (szczególną uwagę należy zwrócić na unikanie wysokich stężeń, które prowadzą do nasycenia procesów kinetycznych). W skład każdej badanej grupy wchodzi co najmniej 10 gryzoni (5 samców i 5 samic), które są narażane na działanie badanej substancji chemicznej przez 6 godzin dziennie, 5 dni w tygodniu, przez okres 4 tygodni (całkowity czas trwania badania wynosi 28 dni). Zwierzęta mogą być również poddawane narażeniu przez 7 dni w tygodniu (np. podczas badania wziewnych produktów farmaceutycznych). Jeśli wiadomo, że jedna płeć jest bardziej podatna na działanie danej badanej substancji chemicznej, osobniki różnej płci mogą być narażane na działanie tej substancji przy różnych poziomach stężenia, aby zoptymalizować zależność stężenie-odpowiedź zgodnie z pkt 15. Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu tylko przez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. W przypadku stosowania okresu narażenia krótszego niż 6 godzin dziennie lub gdy konieczne jest przeprowadzenie badania długotrwałego narażenia całego ciała (np. przez 22 godziny dziennie), należy przedstawić uzasadnienie [zob. GD 39 (2)]. W okresie narażenia należy zaprzestać podawania zwierzętom paszy, chyba że okres ten przekracza 6 godzin. Podczas całego okresu poddawania narażeniu całego ciała można zapewnić dostęp do wody.

15. Wybrane stężenia docelowe powinny oddziaływać na organy docelowe i wykazywać wyraźną zależność stężenie-odpowiedź:

— wysokie stężenie powinno prowadzić do skutków toksycznych, ale nie powinno powodować przewlekłych objawów lub śmiertelności, które uniemożliwiłyby miarodajną ocenę,

— pośrednie stężenia powinny być tak zróżnicowane, aby osiągnąć stopniowanie skutków toksycznych powodowanych przez stężenie najniższe i najwyższe,

— najniższe stężenie powinno nie dawać żadnych objawów toksyczności bądź dawać niewielkie objawy.

Badanie satelitarne (badanie odwracalności)

16. Badanie satelitarne (badanie odwracalności) może być wykorzystywane do obserwacji odwracalności, trwałości lub opóźnionego wystąpienia toksyczności przez odpowiednio długi okres po poddaniu działaniu substancji, jednak przez nie mniej niż 14 dni. Grupy satelitarne (grupy w badaniu odwracalności) składają się z pięciu samców i pięciu samic poddanych narażeniu równocześnie ze zwierzętami doświadczalnymi w badaniu głównym. Grupy satelitarne (grupy w badaniu odwracalności) powinny być narażone na działanie badanej substancji chemicznej przy najwyższym stężeniu, a w razie potrzeby należy zastosować równoległe grupy kontrolne poddane działaniu powietrza lub grupy kontrolne nośnika (zob. pkt 17).

▼M4

Zwierzęta z grupy kontrolnej

17. Zwierzęta z równoległej ujemnej grupy kontrolnej (poddanej działaniu powietrza) powinny być traktowane w taki sam sposób jak zwierzęta z grupy badanej, wyjąwszy fakt, że są one narażane na działanie filtrowanego powietrza zamiast badanej substancji chemicznej. W przypadku gdy do ułatwienia wytworzenia atmosfery na potrzeby badania stosowana jest woda lub inna substancja, do badania należy włączyć grupę kontrolną nośnika zamiast ujemnej grupy kontrolnej (poddanej działaniu powietrza). W miarę możliwości wykorzystywanym nośnikiem powinna być woda. Jeżeli w charakterze nośnika używana jest woda, zwierzęta z grupy kontrolnej powinny być narażone na działanie powietrza o takiej samej wilgotności względnej jak grupy narażone na działanie danej substancji. Wybór odpowiedniego nośnika powinien opierać się na właściwie przeprowadzonym badaniu wstępnym lub danych historycznych. Jeżeli toksyczność nośnika nie jest dobrze znana, kierownik badania może postanowić o zastosowaniu zarówno ujemnej grupy kontrolnej (poddanej działaniu powietrza), jak i grupy kontrolnej nośnika, lecz jest to zdecydowanie odradzane. Jeśli dane historyczne wskazują na to, że nośnik jest nietoksyczny, nie ma potrzeby stosowania ujemnej grupy kontrolnej (poddanej działaniu powietrza) i należy jedynie wykorzystać grupę kontrolną nośnika. Jeśli badanie wstępne badanej substancji chemicznej zawartej w nośniku nie wskazuje na toksyczność, wynika z tego, że dany nośnik jest nietoksyczny przy badanym stężeniu i że należy zastosować grupę kontrolną tego nośnika.

WARUNKI NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Stosowanie stężeń

18. Zwierzęta są poddawane narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej w formie gazu, pary, aerozolu lub mieszaniny tych postaci. Stan fizyczny, który ma być przedmiotem badania, zależy od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, wybranego stężenia lub postaci fizycznej, która najprawdopodobniej będzie występować podczas postępowania z badaną substancją chemiczną i jej stosowania. Badane substancje chemiczne o charakterze higroskopijnym oraz reaktywne chemicznie należy badać w suchej atmosferze. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć osiągnięcia stężenia wybuchowego. Cząstki stałe można poddać procesom mechanicznym w celu zmniejszenia wielkości cząstek. Dalsze wytyczne przedstawiono w GD 39 (2).

Rozkład wielkości cząstek

19. W odniesieniu do wszystkich aerozoli oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole, należy dokonać klasyfikacji cząstek według wielkości. W celu umożliwienia narażenia wszystkich odpowiednich części dróg oddechowych na działanie danej substancji zalecane są aerozole o średnicy aerodynamicznej mediany rozkładu masowego (MMAD) wynoszącej od 1 do 3 μm przy geometrycznym standardowym odchyleniu (σ_g) równym od 1,5 do 3,0 (4). Należy dołożyć rozsądnych starań, aby spełnić tę normę, jednak w razie niemożności jej osiągnięcia należy przedstawić ocenę eksperta. Na przykład cząstki par metali będą mniejsze od tej normy, a naładowane cząstki i włókna mogą ją przekraczać.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej w nośniku

20. Najlepiej byłoby analizować badaną substancję chemiczną bez nośnika. Jeżeli w celu osiągnięcia odpowiedniego stężenia i wielkości cząstek badanej substancji chemicznej konieczne jest stosowanie nośnika, preferowanym nośnikiem powinna być woda. Zawsze kiedy badana substancja chemiczna jest rozpuszczona w nośniku, należy wykazać jej stabilność.

MONITOROWANIE WARUNKÓW NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Przepływ powietrza w komorze

21. Przepływ powietrza przez komorę inhalacyjną powinien być dokładnie kontrolowany, monitorowany w sposób ciągły i rejestrowany przynajmniej co godzinę podczas każdego narażenia. Monitorowanie w czasie rzeczywistym stężenia (lub jego czasowej stabilności) badanej substancji w atmosferze doświadczalnej jest całościowym pomiarem wszystkich parametrów dynamicznych i stanowi pośredni sposób kontrolowania wszystkich istotnych dynamicznych parametrów inhalacyjnych. Jeśli stężenie jest monitorowane w czasie rzeczywistym, częstotliwość pomiaru przepływu powietrza

▼M4

może być zmniejszona do jednego pomiaru dziennie na narażenie. Szczególną uwagę należy zwrócić na unikanie ponownego wdychania w komorach służących do narażania tylko przez nos. Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 19 %, a stężenie dwutlenku węgla nie powinno przekraczać 1 %. Jeżeli istnieją powody, by przypuszczać, że normy tej nie można osiągnąć, należy mierzyć stężenia tlenu i dwutlenku węgla. Jeśli w pierwszym dniu narażenia pomiary wykażą, że stężenia tych gazów są odpowiednie, dalsze pomiary nie powinny być konieczne.

Temperatura i wilgotność względna w komorze

22. W komorze należy utrzymywać temperaturę na poziomie 22 ± 3 °C. Wilgotność względna w strefie oddychania zwierząt powinna być stale monitorowana i rejestrowana co godzinę podczas każdego narażenia, jeżeli to możliwe, zarówno w przypadku narażenia tylko przez nos, jak i narażenia całego ciała. Wilgotność względna powinna być utrzymywana w przedziale od 30 do 70 %, lecz może to być albo nieosiągalne (np. przy badaniu mieszanin na bazie wody), albo niemierzalne z powodu interferencji badanej substancji chemicznej z metodą badawczą.

Badana substancja chemiczna: stężenie nominalne

23. Tam, gdzie to możliwe, należy obliczyć i zarejestrować stężenie nominalne w komorze badawczej. Stężenie nominalne jest to masa wytworzonej badanej substancji chemicznej podzielona przez całkowitą objętość powietrza przepuszczonego przez układ komory inhalacyjnej. Stężenie nominalne nie służy do charakteryzowania narażenia zwierząt, lecz porównanie stężenia nominalnego i stężenia rzeczywistego umożliwia określenie w przybliżeniu efektywności wytwarzania w układzie badawczym, a tym samym można je wykorzystać do wykrywania problemów z wytwarzaniem.

Badana substancja chemiczna: stężenie rzeczywiste

24. Stężenie rzeczywiste to stężenie badanej substancji chemicznej w próbkach pobranych w strefie oddychania zwierząt w komorze inhalacyjnej. Stężenie rzeczywiste można obliczyć za pomocą metod specyficznych (np. bezpośredniego pobierania próbek, metod adsorpcji lub reakcji chemicznej, a następnie charakterystyki analitycznej) lub metod niespecyficznych, takich jak analiza grawimetryczna przy zastosowaniu filtra. Zastosowanie metody grawimetrycznej jest akceptowalne tylko w przypadku aerozoli proszkowych zawierających jeden składnik lub aerozoli cieczy o niskiej lotności i należy wtedy przed badaniem wykonać odpowiednią, specyficzną dla badanej substancji chemicznej charakterystykę. Za pomocą metody grawimetrycznej można również określić stężenie wieloskładnikowego aerozolu proszkowego. Do tego jednak konieczne są dane analityczne, za pomocą których można wykazać, że skład materiału znajdującego się w powietrzu jest podobny do składu materiału wyjściowego. W razie braku takich informacji może być konieczna ponowna analiza badanej substancji chemicznej (najlepiej znajdującej się w powietrzu) w toku badania, w regularnych odstępach czasowych. W przypadku środków w formie aerozoli, które mogą ulec odparowaniu lub sublimacji, należy wykazać, że stosując wybraną metodę, zebrano wszystkie fazy.

25. O ile to możliwe, przez cały czas trwania badania należy używać jednej partii badanej substancji chemicznej, a badana próbka powinna być przechowywana w warunkach zapewniających zachowanie jej czystości, jednorodności i stabilności. Przed rozpoczęciem badania należy scharakteryzować badaną substancję chemiczną, w tym określić jej czystość oraz, o ile jest to wykonalne z technicznego punktu widzenia, tożsamość oraz ilości zidentyfikowanych domieszek i zanieczyszczeń. Można to przedstawić między innymi za pomocą następujących danych: czasu retencji i względnej powierzchni sygnału, masy cząsteczkowej uzyskanej w drodze spektrometrii masowej lub chromatografii gazowej bądź innych oszacowań. Mimo że tożsamość badanej próbki nie należy do obowiązków laboratorium badawczego, rozsądne może być potwierdzenie przez to laboratorium charakterystyki, którą przedstawił sponsor, przynajmniej w ograniczonym zakresie (np. koloru, cech fizycznych itp.).

▼M4

26. Podczas narażenia należy utrzymywać możliwie niezmienną atmosferę doświadczalną. W celu wykazania stabilności warunków narażenia można wykorzystać urządzenie umożliwiające monitorowanie w czasie rzeczywistym, takie jak fotometr w przypadku aerozoli lub analizator węglowodorów całkowitych w przypadku par. Stężenie rzeczywiste w komorze powinno być mierzone co najmniej 3 razy w ciągu każdego dnia narażenia dla każdego poziomu narażenia. Jeśli nie jest to możliwe ze względu na ograniczone natężenie przepływu powietrza lub niskie stężenie, dopuszczalne jest pobieranie jednej próbki na okres narażenia. Najlepiej byłoby, gdyby w takim przypadku próbka była pobierana przez cały okres narażenia. Poszczególne próbki stężenia w komorze nie powinny odbiegać od średniego stężenia w komorze o więcej niż ± 10 % dla gazów i par oraz o więcej niż ± 20 % dla aerozoli ciekłych lub stałych. Należy obliczyć i podać okres wyrównania stężeń w komorze (t_{95}). Czas trwania narażenia obejmuje czas wprowadzania badanej substancji chemicznej do komory. Uwzględnia się w tym okres wyrównania stężeń w komorze (t_{95}) i czas rozpadu. Wytyczne dotyczące szacowania t_{95} można znaleźć w GD 39 (2).

27. W przypadku bardzo złożonych mieszanin składających się z gazów/par i aerozoli (np. w przypadku atmosfery spalania i badanych substancji chemicznych wydzielanych ze specjalnych produktów/urządzeń do zastosowania końcowego) każda faza może zachowywać się inaczej w komorze inhalacyjnej. W związku z tym należy wybrać co najmniej jedną substancję wskaźnikową (analit) dla każdej fazy (gaz/pary i aerozol), zwykle główną substancję czynną w mieszaninie. Jeżeli badana substancja chemiczna jest mieszaniną, należy podać stężenie analityczne w odniesieniu do całej mieszaniny, a nie tylko składnika aktywnego lub substancji wskaźnikowej (analitu). Dodatkowe informacje na temat stężeń rzeczywistych można znaleźć w GD 39 (2).

Badana substancja chemiczna: rozkład wielkości cząstek

28. Rozkład wielkości cząstek aerozoli należy określać co najmniej raz w tygodniu w odniesieniu do każdego poziomu stężenia za pomocą impaktora kaskadowego lub innego instrumentu, takiego jak aerodynamiczny spektrometr pomiaru cząstek. Jeżeli można wykazać równoważność wyników uzyskanych za pośrednictwem impaktora kaskadowego i innego instrumentu, to ten inny instrument może być stosowany przez cały okres badania.

29. W celu potwierdzenia sprawności zatrzymywania cząstek przez instrument główny należy równolegle do tego instrumentu stosować drugie urządzenie, takie jak filtr grawimetryczny lub odpylacz/bełkotka. Stężenie masowe uzyskane na podstawie analizy wielkości cząstek powinno mieścić się w rozsądnych granicach stężenia masowego uzyskanego poprzez analizę filtrów [zob. GD 39 (2)]. Dalsze pomiary potwierdzające można pominąć, jeśli można wykazać równoważność w odniesieniu do wszystkich stężeń badanych w początkowej fazie badania. Ze względu na dobrostan zwierząt należy podjąć środki mające na celu zminimalizowanie ilości danych niejednoznacznych, które mogą spowodować konieczność powtórzenia badania.

30. Klasyfikację cząstek według wielkości należy przeprowadzić w odniesieniu do par, jeżeli istnieje jakakolwiek możliwość tworzenia się aerozolu wskutek kondensacji par lub jeśli cząstki są wykrywane w atmosferze parowej mającej potencjał tworzenia faz mieszanych.

OBSERWACJE

31. Zwierzęta powinny być poddane obserwacji klinicznej przed okresem narażenia, w jego trakcie i po nim. W zależności od reakcji zwierząt podczas narażenia wskazane może być częstsze dokonywanie obserwacji. Jeżeli obserwacja zwierząt jest utrudniona wskutek zastosowania rur unieruchamiających zwierzęta, słabo oświetlonych komór do narażania całego ciała lub nieprzejrzystości powietrza, zwierzęta powinny być uważnie obserwowane po narażeniu. W ramach obserwacji przed kolejnym dniem narażenia można ocenić odwracalność lub nasilenie skutków toksycznych.

▼M4

32. Wszystkie obserwacje są systematycznie zapisywane, przy czym w odniesieniu do każdego zwierzęcia prowadzone są indywidualne rejestry. W przypadku uśmiercenia zwierząt z przyczyn humanitarnych lub stwierdzenia ich zgonu należy możliwie najdokładniej zapisać czas zgonu.

33. Obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować zmiany skóry i sierści, oczu i błon śluzowych; zmiany w układzie oddechowym i układzie krążenia; zmiany w układzie nerwowym oraz zmiany w aktywności somatycznej i sposobie zachowania się. Należy poświęcić uwagę obserwacjom drżenia, konwulsji, ślinotoku, biegunki, letargu, snu i śpiączki. Pomiar temperatury w odbycie może dostarczyć dodatkowych dowodów potwierdzających odruchowe spowolnienie oddechu lub hipo-/hipertermię w związku z poddawaniem działaniu substancji lub przetrzymywaniem w zamknięciu. W protokole badania można uwzględnić dodatkowe oceny, takie jak dotyczące: kinetyki, biomonitoringu, czynności płuc, zatrzymywania słabo rozpuszczalnych substancji, które gromadzą się w tkance płuc, oraz zmian w zachowaniu.

MASA CIAŁA

34. Masę ciała poszczególnych zwierząt należy odnotować tuż przed pierwszym narażeniem (dzień 0), następnie dwa razy w tygodniu (na przykład w piątki i poniedziałki, aby wykazać zdrowienie przez weekend, kiedy nie dochodzi do narażenia, lub w odstępach czasu pozwalających na ocenę toksyczności ogólnoustrojowej) oraz w chwili zgonu lub eutanazji. Jeżeli w ciągu pierwszych 2 tygodni nie wystąpią żadne skutki, przez pozostały czas badania masę ciała można mierzyć co tydzień. Zwierzęta z grupy satelitarnej (grupy w badaniu odwracalności) (jeżeli są wykorzystywane) należy ważyć co tydzień przez cały okres zdrowienia. Na koniec badania wszystkie zwierzęta należy zważyć tuż przed uśmierceniem, aby umożliwić obiektywne obliczenie stosunku masy poszczególnych organów do masy ciała.

SPOŻYCIE POKARMU I WODY

35. Spożycie pokarmu należy mierzyć raz w tygodniu. Spożycie wody również można mierzyć.

PATOLOGIA KLINICZNA

36. Oceny z zakresu patologii klinicznej należy przeprowadzać dla wszystkich zwierząt, w tym zwierząt z grupy satelitarnej (grupy w badaniu odwracalności), gdy są one uśmiercane. Należy odnotować odstęp czasu pomiędzy zakończeniem narażenia a pobraniem krwi, szczególnie gdy odtworzenie danego punktu końcowego zachodzi szybko. Pobranie próbek po zakończeniu narażenia wskazane jest w przypadku tych parametrów, które charakteryzują się krótkim okresem półtrwania w osoczu (np. COHb, CHE i MetHb).

37. Tabela 1 zawiera wykaz parametrów analizy patologicznej, które są na ogół wymagane we wszystkich badaniach toksykologicznych. Badanie moczu nie jest wymagane jako badanie rutynowe, lecz można je wykonać, gdy zostanie to uznane za przydatne na podstawie spodziewanej lub obserwowanej toksyczności. Kierownik badania może zdecydować o ocenie dodatkowych parametrów, aby lepiej scharakteryzować toksyczność badanej substancji chemicznej (np. pseudocholinesterazy, lipidów, hormonów, równowagi kwasowo-zasadowej, methemoglobiny lub ciałek Heinza, kinazy kreatynowej, stosunku komórek mieloidalnych do erytroidalnych, troponin, gazów krwi tętniczej, dehydrogenazy mleczanowej, dehydrogenazy sorbitolowej, dehydrogenazy glutaminianowej oraz gamma-glutamylotranspeptydazy).

▼M4

Tabela 1

Standardowe parametry analizy patologicznej

Hematologia	
Liczba czerwonych krwinek	Całkowita liczba leukocytów
Hematokryt	Różnicowa liczba leukocytów
Stężenie hemoglobiny	Liczba płytek krwi
Średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej	Krzepliwość (wybrać jedną opcję):
Średnia objętość krwinki czerwonej	— Czas protrombinowy
Średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej	— Czas krzepnięcia
Retikulocyty	— Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji
Chemia kliniczna	
Glukoza (*)	Aminotransferaza alaninowa
Cholesterol całkowity	Aminotransferaza asparaginianowa
Trójglicerydy	Fosfataza alkaliczna
Azot mocznikowy we krwi	Potas
Bilirubina całkowita	Sód
Kreatynina	Wapń
Białko całkowite	Fosfor
Albumina	Chlorek
Globulina	
Badanie moczu (opcjonalne)	
Wygląd (barwa i mętność)	Białko całkowite
Objętość	Glukoza
Ciężar właściwy lub osmolalność	Krew/komórki krwi
pH	

(*) Ponieważ długi okres wstrzymywania podawania pokarmu może prowadzić do błędów systematycznych w pomiarach glukozy u zwierząt poddawanych działaniu substancji w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej, kierownik badania powinien zdecydować, czy wstrzymanie karmienia zwierząt jest właściwe. Jeżeli stosowane jest wstrzymanie podawania pokarmu, jego okres powinien być odpowiedni dla wykorzystywanych gatunków zwierząt; w przypadku szczura może to być 16 h (niekarmienie przez noc). Oznaczenie glukozy na czczo można przeprowadzić po wstrzymaniu podawania pożywienia przez całą noc w ciągu ostatniego tygodnia narażenia lub po całonocnym niekarmieniu przed sekcją zwłok (w tym ostatnim przypadku wraz z pomiarem wszystkich innych parametrów analizy patologicznej).

38. Jeżeli istnieją dowody na to, że dolne drogi oddechowe (tj. pęcherzyki płucne) są głównym miejscem osadzania się i zatrzymywania danej substancji, preferowaną techniką ilościowej analizy hipotetycznych parametrów efektu dawki związanych z zapaleniem pęcherzyków płucnych, zapaleniem płuc i fosfolipidozą może być płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe. Umożliwia to właściwe zbadanie zależności dawka-odpowiedź i zmian uszkodzeń pęcherzyków płucnych w funkcji czasu. Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe można badać pod kątem całkowitej i różnicowej liczby leukocytów, białka całkowitego oraz dehydrogenazy mleczanowej. Innymi parametrami, które można wziąć pod uwagę, są te, które wskazują na uszkodzenia lizosomów, fosfolipidozę, zwłóknienie oraz stan zapalny wskutek podrażnienia lub stan alergiczny, który może wymagać oznaczenia cytokin/chemokin prozapalnych. Pomiary popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych na ogół uzupełniają wyniki badań histopatologicznych, lecz nie mogą ich zastępować. Wytyczne dotyczące przeprowadzania płukania oskrzelowo-pęcherzykowego można znaleźć w GD 39 (2).

▼M4

WYRAŹNE ZMIANY PATOLOGICZNE I MASA ORGANÓW

39. Wszystkie badane zwierzęta, w tym te, które padły podczas badania lub zostały wyeliminowane z badania ze względu na ich dobrostan, powinny zostać poddane całkowitemu wykrwawieniu (jeżeli to możliwe) i pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu. Należy odnotować czas pomiędzy zakończeniem ostatniego narażenia każdego zwierzęcia a jego uśmierceniem. Jeżeli sekcji zwłok nie można przeprowadzić natychmiast po znalezieniu martwego zwierzęcia, zwierzę należy schłodzić (nie zamrozić) do temperatury wystarczająco niskiej do zminimalizowania autolizy. Sekcję zwłok należy przeprowadzić możliwie szybko, zwykle w ciągu jednego lub dwóch dni. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy odnotować wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne ze szczególnym uwzględnieniem wszelkich zmian w drogach oddechowych.

40. Tabela 2 zawiera wykaz organów i tkanek, które należy zachować w odpowiednim środku w trakcie pełnego rozpoznania histopatologicznego na potrzeby badania histopatologicznego. Organy i tkanki [wymienione w nawiasach kwadratowych] oraz wszelkie inne organy i tkanki można zachować według uznania kierownika badania. Organy wymienione **czcionką pogrubioną** należy okroić i zważyć w stanie wilgotnym niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji w celu uniknięcia wyschnięcia. Tarczycę i najądrza należy zważyć wyłącznie wówczas, gdy jest to konieczne, ponieważ okrajanie artefaktów może utrudnić ocenę histopatologiczną. Tkanki i organy należy utrwalić w 10 % roztworze buforowanej formaliny lub innej odpowiedniej substancji utrwalającej niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji zwłok i nie później niż na 24–48 godzin przed okrojeniem, w zależności od stosowanej substancji utrwalającej.

Tabela 2

Organy i tkanki zachowywane w trakcie pełnego rozpoznania histopatologicznego

Nadnercza	Pęcherzyki nasienne
Szpik kostny (lub świeży aspirat)	Rdzeń kręgowy (odcinek szyjny, śródpiersiowy i lędźwiowy)
Mózg (w tym wycinki kresomózgowia, móżdżku i rdzenia/mostu)	**Śledziona**
[Oczy (siatkówka, nerw wzrokowy) i powieki]	Żołądek
Serce	**Jądra**
Nerki	**Grasica**
Krtań (3 poziomy, w tym 1 zawierający podstawę nagłośni)	Tarczyca
Wątroba	Tchawica (co najmniej 2 wycinki, w tym 1 wycinek pobrany podłużnie poprzez ostrogę i 1 wycinek pobrany poprzecznie)
Płuco (wszystkie płaty na jednym poziomie, w tym oskrzela główne)	[Pęcherz moczowy]
Węzły chłonne z okolicy wnęki płuca, szczególnie w przypadku badań słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych mających postać cząstek stałych. Na potrzeby bardziej pogłębionych badań lub badań immunologicznych można wziąć pod uwagę dodatkowe węzły chłonne, np. z części śródpiersiowej, szyjnej/podżuchwowej lub usznej.	Macica
Tkanki nosogardła (co najmniej 4 poziomy; 1 poziom ma obejmować przewód nosowo-gardłowy i tkankę limfatyczną związaną ze śluzówką nosa (NALT))	Wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne
Przełyk	
[Opuszka węchowa]	
Jajniki	

▼M4

41. Płuca należy usunąć w stanie nienaruszonym, zważyć i zaaplikować odpowiednią substancję utrwalającą pod ciśnieniem 20–30 cm wody celem zapewnienia utrzymania ich struktury (5). Wycinki należy pobrać dla wszystkich płatów na jednym poziomie, w tym z oskrzeli głównych, lecz w przypadku przeprowadzania płukania oskrzelowo-pęcherzykowego z nieprzepłukanego płatu należy pobrać wycinki na trzech poziomach (nie szeregowo).

42. Należy zbadać co najmniej 4 poziomy tkanek nosogardła, z których jeden powinien obejmować przewód nosowo-gardłowy (5, 6, 7, 8, 9), aby umożliwić odpowiednie zbadanie nabłonka płaskiego, przejściowego (oddechowego nieurzęsionego), oddechowego (oddechowego urzęsionego) i węchowego, a także tkanki limfatycznej związanej ze śluzówką nosa (NALT; 10, 11). Należy zbadać trzy poziomy krtani, a jeden z tych poziomów powinien obejmować podstawę nagłośni (12). Należy zbadać co najmniej dwa poziomy tchawicy, w tym pobrać jeden wycinek pobrany podłużnie przez ostrogę rozgałęzienia oskrzeli pozapłucnych i jeden wycinek pobrany poprzecznie.

HISTOPATOLOGIA

43. Ocenę histopatologiczną wszystkich organów i tkanek wymienionych w tabeli 2 należy przeprowadzić w odniesieniu do grupy kontrolnej i grupy otrzymującej wysokie stężenie substancji, a także wszystkich zwierząt, które padły lub zostały uśmiercone podczas badania. Szczególną uwagę należy zwrócić na drogi oddechowe, organy docelowe i makroskopowe zmiany patologiczne. Organy i tkanki zwierząt z grupy otrzymującej wysokie stężenie substancji, w których stwierdzono zmiany patologiczne, należy zbadać we wszystkich grupach. Kierownik badania może zdecydować o przeprowadzeniu ocen histopatologicznych dla dodatkowych grup, aby wykazać wyraźną zależność stężenie-odpowiedź. Jeśli używa się grupy satelitarnej (grupy w badaniu odwracalności), należy przeprowadzić ocenę histopatologiczną wszystkich tkanek i organów, w których stwierdzono skutki podania substancji w grupach otrzymujących substancję badaną. W przypadku występowania nadmiernej liczby wczesnych zgonów lub innych problemów w grupie poddawanej wysokiemu narażeniu, które negatywnie wpływają na istotność danych, badania histopatologiczne należy przeprowadzić w grupie otrzymującej daną substancję o kolejnym, niższym stężeniu. Należy podjąć próbę skorelowania wyników całości obserwacji z wynikami badań mikroskopowych.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

44. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy przedstawić dane dotyczące masy ciała, spożycia pokarmu, patologii klinicznej, wyraźnych zmian patologicznych, masy organów i histopatologii. Dane z obserwacji klinicznych należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę wykorzystanych zwierząt, liczbę zwierząt wykazujących specyficzne objawy toksyczności, liczbę zwierząt padłych w trakcie trwania badania lub uśmierconych z przyczyn humanitarnych, czasu zgonu poszczególnych zwierząt, opis skutków toksycznych oraz ich przebieg w czasie i odwracalność, a także wyniki sekcji zwłok. Wszystkie wyniki ilościowe i dodatkowe należy ocenić za pomocą właściwej metody statystycznej. Można zastosować dowolną ogólnie przyjętą metodę statystyczną, przy czym wyboru metod statystycznych należy dokonać podczas przygotowywania projektu badania.

Sprawozdanie z badania

45. Sprawozdanie z badania powinno w stosownych przypadkach zawierać następujące informacje:

Badane zwierzęta i ich hodowla

— opis warunków przetrzymywania w klatkach, w tym: liczba (lub zmiana liczby) zwierząt na klatkę, ściółka, temperatura otoczenia i wilgotność względna, fotoperiod i określenie diety,

▼M4

— wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie zastosowania gatunków innych niż szczur. Można przedstawić źródło i dane historyczne, jeżeli dotyczą one zwierząt poddanych podobnemu narażeniu oraz warunkom przebywania i żywieniowym,

— liczba, wiek i płeć zwierząt,

— metoda randomizacji,

— opis wszelkich przygotowań przed badaniem, w tym diety, kwarantanny i leczenia chorób.

Badana substancja chemiczna

— cechy fizyczne, czystość oraz w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (w tym izomeryzacja),

— dane identyfikacyjne i numer w rejestrze Chemical Abstract Services (CAS), jeżeli jest znany.

Nośnik

— uzasadnienie zastosowania nośnika oraz uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda),

— dane historyczne lub równoległe wykazujące, że nośnik nie zakłóca wyniku badania.

Komora inhalacyjna

— szczegółowy opis komory inhalacyjnej, w tym jej rozmiary i schemat,

— źródło i opis wyposażenia wykorzystywanego do celów narażenia zwierząt, jak również do wytwarzania atmosfery,

— wyposażenie do pomiaru temperatury, wilgotności, rozmiaru cząstek i stężenia rzeczywistego,.

— źródło powietrza i system klimatyzacji,

— metody kalibracji wyposażenia w celu zapewnienia jednorodnej atmosfery na potrzeby badania,

— różnica ciśnienia (dodatnia lub ujemna),

— porty narażenia w komorze (narażenie tylko przez nos); lokalizacja zwierząt w komorze (narażenie całego ciała),

— stabilność atmosfery doświadczalnej,

— lokalizacja czujników temperatury i wilgotności oraz pobieranie próbek powietrza w komorze,

— oczyszczanie dostarczanego/odprowadzanego powietrza,

— natężenie przepływu powietrza, natężenie przepływu powietrza/port narażenia (narażenie tylko przez nos) lub ładunek zwierząt/komorę (narażenie całego ciała),

— okres wyrównania stężeń w komorze inhalacyjnej (t_{95}),

— liczba zmian objętości na godzinę,

— urządzenia pomiarowe (w stosownych przypadkach).

Dane dotyczące narażenia

— uzasadnienie wyboru docelowego stężenia w badaniu głównym,

▼M4

— stężenia nominalne (całkowita masa badanej substancji chemicznej wprowadzonej do komory inhalacyjnej podzielona przez ilość powietrza przepuszczonego przez komorę),

— rzeczywiste stężenia badanej substancji chemicznej w próbkach ze strefy oddychania zwierząt; w przypadku mieszanin, które tworzą heterogeniczne formy fizyczne (gazy, pary, aerozole), każdą substancję można analizować oddzielnie,

— wszystkie stężenia substancji w powietrzu należy podawać w jednostkach masy (mg/l, mg/m^3 itd.), a nie w jednostkach objętości (ppm, ppb itd.),

— rozkład wielkości cząstek, średnica aerodynamiczna mediany rozkładu masowego (MMAD) oraz geometryczne standardowe odchylenie (σ_g), w tym metody ich obliczania. Należy odnotować poszczególne analizy wielkości cząstek.

Warunki badania

— szczegółowe informacje na temat przygotowania badanej substancji chemicznej, w tym szczegóły dotyczące wszelkich procedur zastosowanych w celu zmniejszenia rozmiaru cząstek ciał stałych lub przygotowania roztworów badanej substancji chemicznej,

— opis (najlepiej wraz ze schematem) wyposażenia wykorzystywanego do wytworzenia atmosfery na potrzeby badania i narażania zwierząt na jej działanie,

— szczegółowe informacje na temat wyposażenia stosowanego do monitorowania temperatury, wilgotności i przepływu powietrza w komorze (tj. opracowanie krzywej kalibracyjnej),

— szczegółowe informacje na temat wyposażenia stosowanego do pobierania próbek na potrzeby określenia stężenia w komorze i rozkładu wielkości cząstek,

— szczegółowe informacje na temat zastosowanej metody analizy chemicznej oraz walidacji metody (w tym wydajność odzysku badanej substancji chemicznej ze środka do pobierania próbek),

— metoda randomizacji przypisywania zwierząt do grupy badanej i grupy kontrolnej,

— szczegółowe informacje na temat jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety, źródło wody),

— uzasadnienie wyboru badanych stężeń.

Wyniki

— tabelaryczne zestawienie temperatury, wilgotności i przepływu powietrza w komorze,

— tabelaryczne zestawienie danych dotyczących nominalnego i rzeczywistego stężenia w komorze,

— tabelaryczne zestawienie danych dotyczących rozmiaru cząstek, w tym danych dotyczących gromadzenia próbek analitycznych, rozkładu wielkości cząstek oraz obliczenia średnicy aerodynamicznej mediany rozkładu masowego (MMAD) i σ_g,

— tabelaryczne zestawienie danych dotyczących reakcji i poziomu stężenia dla każdego zwierzęcia (tj. zwierząt wykazujących oznaki toksyczności, w tym śmiertelność, rodzaj, ostrość, czas pojawienia się i czas trwania objawów),

▼M4

— tabelaryczne zestawienie masy poszczególnych zwierząt,

— tabelaryczne zestawienie spożycia pokarmu,

— tabelaryczne zestawienie danych z zakresu patologii klinicznej,

— wyniki sekcji zwłok oraz badań histopatologicznych w odniesieniu do każdego zwierzęcia, jeżeli są dostępne,

— tabelaryczne zestawienie wszelkich innych mierzonych parametrów.

Omówienie i interpretacja wyników

— szczególny nacisk należy położyć na opis metod zastosowanych w celu spełnienia kryteriów niniejszej metody badawczej, np. dotyczących stężenia granicznego lub rozmiaru cząstek,

— należy uwzględnić respirabilność cząstek w świetle wyników ogólnych, szczególnie jeżeli nie można było spełnić kryterium rozmiaru cząstek,

— w ogólnej ocenie badania należy uwzględnić spójność metod zastosowanych w celu określenia nominalnego i rzeczywistego stężenia oraz relacji między stężeniem rzeczywistym a nominalnym,

— należy uwzględnić prawdopodobną przyczynę zgonu i dominujący sposób działania (ogólnoustrojowy w porównaniu z miejscowym),

— należy przedstawić wyjaśnienie, jeżeli zaistniała konieczność humanitarnego uśmiercenia zwierząt wykazujących oznaki bólu lub objawy ostrego i przewlekłego stresu, zgodnie z kryteriami zawartymi w wytycznych OECD dotyczących humanitarnego punktu końcowego (3),

— należy określić organy docelowe,

— należy określić NOAEL i LOAEL.

BIBLIOGRAFIA:

(1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, pierwotna wersja dotyczącej badań wytycznej OECD nr 412, Dyrekcja ds. Środowiska, OECD, Paryż.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment nr 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paryż.

(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 nr 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paryż.

(4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Biuro ds. Programów Stosowania Pestycydów, Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (rozdział 9) w: Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. i Brain, J.D. (red.), Springer Verlag Heidelberg, s. 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. W: Waalkes MP i Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, Nowy Jork, 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, Art. 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) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1).

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICJA

Badana substancja chemiczna:	jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.;

▼B

B.9. **TOKSYCZNOŚĆ POWTARZANEJ (28 DNI) DAWKI (DERMALNA)**

1. **METODA**

1.1. WPROWADZENIE

Zob. Wprowadzenie ogólne część B lit. A).

1.2. DEFINICJE

Zob. Wprowadzenie ogólne część B lit. B).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Substancję badaną podaje się na skórę w stopniowanych dawkach kilku grupom zwierząt doświadczalnych, po jednej dawce na grupę, przez okres 28 dni. W okresie podawania prowadzi się codzienną obserwację zwierząt w celu wykrycia objawów toksyczności. Zwierzęta, które zdechną w trakcie badania, i te, które przeżyją po jego zakończeniu, poddaje się sekcji zwłok.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA

1.6.1. **Przygotowania**

Zwierzęta muszą być trzymane w doświadczalnych warunkach pobytu i karmienia przez co najmniej pięć dni przed przeprowadzeniem badania. Przed przeprowadzeniem badania zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta są wybierane losowo i przydzielane do poszczególnych grup poddanych działaniu substancji i kontrolnych. Na krótko przed rozpoczęciem eksperymentu należy usunąć sierść z grzbietowej powierzchni tułowia zwierząt przez przycięcie lub ogolenie. Można zastosować ogolenie, jednak należy je przeprowadzić na około 24 godziny przed rozpoczęciem badania. Na ogół konieczne jest powtarzanie przycinania lub golenia sierści w odstępach około jednego tygodnia. Podczas przycinania lub golenia sierści należy uważać, aby nie uszkodzić skóry. Nie mniej niż 10 % powierzchni ciała powinno być wolne w celu zastosowania substancji badanej. Przy podejmowaniu decyzji o wielkości powierzchni ciała, jaką należy oczyścić, oraz o rozmiarach pokrycia tej powierzchni substancją należy uwzględnić masę ciała zwierzęcia. Przy badaniu ciała stałego, które można sproszkować gdy to stosowne, substancja badana powinna być wystarczająco nawilżona wodą lub, w miarę potrzeby, stosownym podłożem dla zapewnienia dobrego kontaktu ze skórą. Płynne substancje badane stosuje się na ogół w stanie nierozcieńczonym. Substancję stosuje się codziennie przez pięć do siedmiu dni w tygodniu.

1.6.2. **Warunki badania**

1.6.2.1. *Zwierzęta doświadczalne*

Można wykorzystać dorosłe szczury, króliki lub świnki morskie. Można stosować inne gatunki, lecz ich użycie wymaga uzasadnienia.

▼B

Na początku badania zmienność masy ciała zastosowanych zwierząt nie powinna przekraczać ± 20 % odpowiedniej wartości średniej.

1.6.2.2. *Liczba i płeć*

Wykorzystuje się co najmniej 10 zwierząt (pięć samic i pięciu samców) ze zdrową, nienaruszoną skórą w przypadku każdego poziomu dawkowania. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. Jeżeli planuje się uśmiercanie zwierząt w międzyczasie, ogólna ich liczba powinna być zwiększona o liczbę zwierząt zaplanowanych do uśmiercenia przed zakończeniem badania. Dodatkowo, grupa satelicka 10 zwierząt (pięć zwierząt każdej płci) może być poddana działaniu wysokiego poziomu dawki przez 28 dni i obserwowana, przez 14 dni po dawkowaniu, pod kątem odwracalności, trwałości i opóźnionego wystąpienia objawów zatrucia. Jest także stosowana grupa satelicka 10 zwierząt kontrolnych (pięć zwierząt każdej płci).

1.6.2.3. *Wielkości dawek*

Należy zastosować co najmniej trzy wielkości dawek z grupą kontrolną lub grupą kontrolną otrzymującą podłoże, o ile to ostatnie jest stosowane. Czas ekspozycji powinien wynosić co najmniej sześć godzin na dobę. Substancję badaną należy podawać o podobnej porze każdego dnia, przy czym wielkości dawek należy tak dostosowywać w odpowiednich odstępach czasu (co tydzień lub co dwa tygodnie), aby utrzymać stałą wielkość dawki w przeliczeniu na masę ciała zwierzęcia. Z wyjątkiem zastosowania substancji badanej, ze zwierzętami grupy kontrolnej powinno się obchodzić w sposób identyczny jak z podmiotami grupy badanej. W przypadku stosowania podłoża w celu ułatwienia dawkowania, u zwierząt kontrolnych otrzymujących podłoże należy stosować samo to podłoże w taki sam sposób, jak w grupach otrzymujących substancję badaną, w takiej samej dawce, jak stosowana w grupie otrzymującej najwyższą dawkę. Najwyższa dawka powinna być tak dobrana, aby wywierała działanie toksyczne, jednak nie prowadziła do zgonów lub prowadziła do jedynie niewielu zgonów. Najniższa dawka nie powinna dawać żadnych objawów toksyczności. W przypadku gdy istnieje możliwa do wykorzystania, oszacowana wielkość ekspozycji u ludzi, najniższy poziom dawkowania powinien ją przewyższać. W idealnej sytuacji pośredni poziom dawkowania powinien prowadzić do uzyskania minimalnych dostrzegalnych efektów toksycznych. W przypadku gdy zostanie wykorzystana więcej niż jedna dawka pośrednia, wielkości dawek powinny być tak rozstawione, aby uzyskać stopniowanie działań toksycznych. W grupach otrzymujących niskie i pośrednie dawki oraz w grupach kontrolnych częstość występowania zgonów powinna być niska, aby umożliwić znaczącą ocenę wyników.

W przypadku gdy zastosowanie substancji badanej wiąże się z ciężkim działaniem drażniącym na skórę, stężenia należy zmniejszyć, przy czym może to spowodować zmniejszenie pojawiania się lub brak innych skutków toksycznych przy najwyższym poziomie dawkowania. Ponadto w przypadku znacznego uszkodzenia skóry może być konieczne przerwanie badania i podjęcie nowego eksperymentu z zastosowaniem niższych stężeń.

1.6.2.4. *Czas ekspozycji*

W przypadku gdy w badaniu wstępnym z zastosowaniem dawki 1 000 mg/kg lub wyższej, odpowiadającej potencjalnej ekspozycji u ludzi, o ile taki poziom jest znany, nie zostaną stwierdzone żadne efekty toksyczne, można uznać, że dalsze badania nie są potrzebne.

1.6.2.5. *Okres obserwacji*

Zwierzęta doświadczalne należy obserwować codziennie pod kątem występowania objawów toksyczności. Należy zapisać czas zgonu zwierzęcia i czas pojawienia się i ustąpienia objawów toksyczności.

▼B

1.6.3. **Procedura**

Zwierzęta powinny być trzymane w oddzielnych klatkach. W idealnej sytuacji podaje się im substancję badaną przez siedem dni w tygodniu przez okres 28 dni. Zwierzęta w grupach satelickich, w których planuje się późniejszą obserwację, powinny zostać przetrzymane przez następnych 14 dni bez podawania im substancji w celu stwierdzenia ustępowania lub utrzymywania się działań toksycznych. Czas ekspozycji powinien wynosić co najmniej sześć godzin na dobę.

Substancja badana powinna zostać nałożona w sposób równomierny na obszar równy około 10 % całkowitej powierzchni ciała. W przypadku substancji wysoce toksycznych można je nanieść na mniejszą powierzchnię, jednak należy dążyć do tego, aby pokryć jak największy obszar jak najcieńszą i jak najbardziej równomierną warstwą badanego związku.

W trakcie ekspozycji substancja badana jest utrzymywana w kontakcie ze skórą dzięki zastosowaniu porowatego opatrunku z gazy i niedrażniącej taśmy. Miejsce badania należy dodatkowo przykryć w taki sposób, aby utrzymać opatrunek z gazy i substancję badaną i zapewnić, aby zwierzęta nie mogły zjeść tej ostatniej. W celu zapobieżenia spożyciu substancji badanej można uwiązać zwierzę, jednak pełna immobilizacja nie jest zalecaną metodą. Jako alternatywę można zastosować „kołnierzowy przyrząd zabezpieczający”.

Pod koniec okresu ekspozycji należy usunąć resztki badanej substancji, w miarę możliwości stosując wodę lub jakieś inne, właściwe metody oczyszczania skóry.

Wszystkie zwierzęta należy obserwować codziennie i odnotowywać występujące u nich objawy toksyczności, włącznie z czasem ich pojawienia się, stopniem ich ciężkości i czasem trwania. Obserwacje przy klatce zwierzęcia powinny obejmować zmiany skóry i sierści, oczu i błon śluzowych oraz zmiany układu oddechowego, krążenia, autonomicznego i ośrodkowego układu nerwowego, jak też wzorców aktywności somatomotorycznej i wzorca zachowania. Co tydzień należy ważyć zwierzęta. Zaleca się także przeprowadzanie cotygodniowych pomiarów wielkości spożycia karmy. Regularna obserwacja zwierząt jest niezbędna do tego, aby w możliwym zakresie nie stracić zwierząt badanych z takich przyczyn, jak kanibalizm, autoliza tkanek lub przemieszczenie. Pod koniec okresu badania wszystkie osobniki, które przeżyły w grupach innych niż satelicka, poddaje się sekcji zwłok. Zwierzęta konające oraz zwierzęta przejawiające ostre cierpienie i ból powinny być usuwane, gdy zostanie to zauważone, humanitarnie zabite i poddane sekcji zwłok.

Następujące badania należy wykonać pod koniec okresu badania u wszystkich zwierząt, włącznie z osobnikami w grupie kontrolnej:

1) badania hematologiczne, w tym co najmniej hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczba erytrocytów, liczba leukocytów z rozmazem i oznaczenie parametrów krzepnięcia;

2) laboratoryjne badania biochemiczne krwi zawierające co najmniej jeden parametr funkcji wątroby i nerek: aktywność aminotransferazy alaninowej (uprzednio nazywanej transferazą glutaminianowo-piro- gronową) w surowicy, aktywność aminotransferazy asparaginianowej (uprzednio nazywanej transferazą glutaminianowo-szczawiooctową) w surowicy, stężenie azotu mocznikowego, albumin, kreatyniny we krwi, całkowite stężenie bilirubiny i całkowite stężenie białka w surowicy.

Do innych oznaczeń, które mogą okazać się niezbędne do odpowiedniej oceny toksykologicznej, należą oznaczenia stężenia wapnia, fosforu, chlorków, sodu, potasu, glukozy na czczo, lipidogram, stężenia hormonów i oznaczenia równowagi kwasowo-zasadowej, stężenia methemoglobiny oraz aktywności cholinesterazy.

▼B

W razie potrzeby można zastosować dodatkowe oznaczenia biochemiczne, aby rozszerzyć badania zaobserwowanych działań toksycznych.

1.6.4. **Pełne badanie patomorfologiczne**

Wszystkie zwierzęta objęte badaniem powinny zostać poddane pełnemu makroskopowemu badaniu patomorfologicznemu. Należy zważyć wątrobę, nerki, nadnercza i jądra w stanie wilgotnym, najszybciej, jak to będzie możliwe po rozcięciu zwłok, aby uniknąć wysuszenia. Narządy i tkanki, tj. prawidłową i poddawaną ekspozycji na substancję skórę, wątrobę, nerki i narządy docelowe (czyli narządy wykazujące makroskopowe zmiany patologiczne lub o nieprawidłowych wymiarach) należy zakonserwować w odpowiednim środku w celu przeprowadzenia ewentualnych, przyszłych badań histopatologicznych.

1.6.5. **Badania histopatologiczne**

W grupie otrzymującej najwyższą dawkę i w grupie kontrolnej należy wykonać badanie histologiczne zakonserwowanych narządów i tkanek. We wszystkich grupach otrzymujących niższe dawki należy przeprowadzić badanie tych narządów i tkanek, w których stwierdzono zmiany przypisywane badanej substancji przy zastosowaniu najwyższych dawek. Należy również przeprowadzić badanie histologiczne zwierząt w grupie satelickiej, ze szczególnym naciskiem na te narządy i tkanki, w których stwierdzono skutki podania substancji w innych badanych grupach.

2. **DANE**

Dane należy przedstawić w skrócie w formie tabelarycznej, z podaniem – dla każdej badanej grupy – liczby zwierząt na początku badania oraz liczby zwierząt z każdym rodzajem zmiany patologicznej.

Wszystkie zaobserwowane zmiany należy ocenić przy pomocy właściwej metody statystycznej. Można zastosować dowolną, uznaną metodę statystyczną.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— dane zwierząt (gatunek, szczep, źródło, warunki środowiska, dieta itp.),

— warunki badania (włączając typ opatrunku: okluzyjny lub nieokluzyjny),

— wielkości dawek (włączając podłoże, o ile jest wykorzystane) i stężenia,

— poziom niewywierający działania, o ile to możliwe,

— dane reakcji toksycznej w rozbiciu na płci i dawki,

— czas zgonu w trakcie badania lub fakt, że zwierzęta przeżyły do jego zakończenia,

— działania toksyczne lub inne,

— czas zaobserwowania każdego nieprawidłowego objawu i późniejszy przebieg zmian,

— dane na temat karmy i masy ciała,

— zastosowane badania hematologiczne i ich wyniki,

▼B

— zastosowane laboratoryjne badania biochemiczne i ich wyniki,

— wyniki sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników histopatologicznych,

— gdzie to możliwe, statystyczna obróbka wyników,

— omówienie wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. OCENA I INTERPRETACJA

Zob. Wprowadzenie ogólne część B lit. D).

4. **LITERATURA**

Zob. Wprowadzenie ogólne część B lit. E).

▼M7

B.10. **BADANIE ABERRACJI CHROMOSOMOWEJ W KOMÓRKACH SSAKÓW *IN VITRO***

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 473 (2016). Stanowi ona część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. Opracowany został dokument OECD, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd ostatnich zmian, jakie wprowadzono do wytycznych dotyczących badań (1).

Celem badania aberracji chromosomowej *in vitro* jest zidentyfikowanie substancji chemicznych, które powodują strukturalne aberracje chromosomowe w hodowanych komórkach ssaków (2) (3) (4). Strukturalne aberracje mogą występować w dwóch typach – chromosomowym lub chromatydowym. W trakcie przeprowadzania testów aberracji chromosomowych *in vitro* może wystąpić poliploidalność (w tym endoreduplikacja). Mimo że aneugeny mogą powodować poliploidalność, sama poliploidalność nie musi jednak świadczyć o właściwościach aneugenicznych i może stanowić po prostu skutek zaburzenia cyklu komórkowego lub cytotoksyczności (5). Celem niniejszego testu nie jest pomiar aneuploidii. W celu wykrycia aneuploidii zalecane będzie przeprowadzenie testu mikrojądrowego *in vitro* (6).

W badaniu aberracji chromosomowej w komórkach ssaków *in vitro* można wykorzystywać kultury ustanowionych linii komórkowych lub pierwotne hodowle komórek pochodzących od człowieka lub od gryzoni. Wykorzystywane komórki należy dobierać na podstawie ich zdolności do wzrostu w kulturach, stabilności kariotypu (w tym liczby chromosomów) oraz spontanicznych częstości występowania aberracji chromosomowych (7). W chwili obecnej dostępne dane nie pozwalają na opracowanie konkretnych zaleceń, ale wynika z nich, że istotne jest, aby podczas oceny zagrożeń stwarzanych przez substancje chemiczne wziąć pod uwagę status białka *p53*, stabilność genetyczną (kariotypową), zdolność do naprawy DNA oraz pochodzenie (od gryzoni lub od człowieka) komórek wybranych do badania. Zachęca się zatem użytkowników niniejszej metody badawczej do uwzględniania wpływu tych oraz innych właściwości komórek na zachowanie linii komórkowej przy wykrywaniu indukcji aberracji chromosomowych w miarę rozwoju wiedzy w tej dziedzinie.

Stosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

Badania przeprowadzane *in vitro* wymagają zazwyczaj wykorzystania egzogennego źródła aktywacji metabolicznej, chyba że komórki są metabolicznie wydolne w odniesieniu do badanych substancji chemicznych. Egzogenny układ metabolizujący nie jest w stanie całkowicie naśladować warunków *in vivo*. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć wystąpienia warunków, które mogą doprowadzić do zniekształconych wyników dodatnich, tj. uszkodzenia chromosomu niespowodowanego bezpośrednią interakcją między badanymi substancjami chemicznymi a chromosomami; do takich warunków zalicza się zmiany pH lub osmolalność (8) (9) (10), interakcje z elementami podłoża (11) (12) bądź zbyt wysokie poziomy cytotoksyczności (13) (14) (15) (16).

Test ten wykorzystuje się do wykrywania aberracji chromosomowych, które mogą wynikać ze zdarzeń klastogennych. Analizę indukcji aberracji chromosomowej należy przeprowadzić przy użyciu komórek w metafazie. Dlatego istotne jest, aby komórki przeszły mitozę zarówno w kulturach poddanych, jak i niepoddanych działaniu substancji chemicznej. W przypadku wytworzonych nanomateriałów konieczne może być specjalne dostosowanie niniejszej metody badawczej, które jednak nie zostało tu opisane.

Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

▼M7

ZASADA BADANIA

Kultury komórkowe pochodzące od ludzi lub od innych ssaków poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej zarówno z zastosowaniem egzogennego źródła aktywacji metabolicznej, jak i bez takiego źródła, pod warunkiem że nie wykorzystuje się komórek o odpowiednich zdolnościach metabolicznych (zob. pkt 13). W odpowiednich z góry określonych odstępach czasu po rozpoczęciu poddawania kultur komórkowych działaniu badanej substancji chemicznej są one poddawane działaniu substancji chemicznej zatrzymującej metafazę (np. colcemidu lub kolchicyny), następnie pobierane i barwione, a komórki w metafazie są analizowane pod mikroskopem na obecność aberracji typu chromatydowego i chromosomowego.

OPIS METODY

Przygotowania

Komórki

Można korzystać z różnych linii komórkowych (np. komórek jajnika chomika chińskiego (CHO), komórek płucnych chomika chińskiego V79, komórek płucnych chomika chińskiego (CHL)/IU, TK6) lub pierwotnych hodowli komórek, w tym limfocytów krwi obwodowej ludzi lub innych ssaków (7). Należy przedstawić naukowe uzasadnienie wyboru linii komórkowych. Jeżeli stosowane są komórki pierwotne, ze względu na dobrostan zwierząt należy rozważyć użycie komórek pierwotnych pochodzących od ludzi, jeżeli jest to możliwe; należy je pobrać w zgodzie z zasadami etycznymi i przepisami mającymi zastosowanie do ludzi. Ludzkie limfocyty krwi obwodowej należy pozyskiwać od młodych (w wieku około 18–35 lat) niepalących osób, u których nie stwierdzono żadnych schorzeń oraz które nie były narażone w ostatnim czasie na czynniki genotoksyczne (tj. substancje chemiczne, promieniowanie jonizujące) w stopniu, który mógłby zwiększyć podstawową częstość występowania aberracji chromosomowych. Zagwarantuje to niską i stałą podstawową częstość występowania aberracji chromosomowych. Wyjściowa częstość występowania aberracji chromosomowych wzrasta wraz z wiekiem, a tendencja ta jest bardziej widoczna u kobiet niż u mężczyzn (17) (18). Jeżeli dla celów stosowania łączy się komórki pochodzące od większej liczby dawców niż jeden, należy wskazać liczbę dawców. Należy wykazać, że komórki uległy podziałowi w okresie od rozpoczęcia poddawania ich działaniu badanej substancji chemicznej do momentu pobrania próbek. Kultury komórkowe utrzymuje się w fazie wzrostu wykładniczego (linie komórkowe) bądź stymuluje się ich podział (pierwotne kultury limfocytów) celem narażenia komórek na działanie badanej substancji chemicznej w różnych stadiach cyklu komórkowego, ponieważ czułość stadiów komórek na badaną substancję chemiczną może być nieznana. Komórki pierwotne, które wymagają stymulacji mitogenami, aby się podzielić, zasadniczo nie podlegają synchronizacji podczas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej (np. limfocyty ludzkie po 48-godzinnej stymulacji mitogenami). Wykorzystywanie zsynchronizowanych komórek podczas podawania badanej substancji chemicznej nie jest zalecane, ale może zostać zaakceptowane w uzasadnionych przypadkach.

Podłoża i warunki hodowli

W celu utrzymania kultur należy zastosować odpowiednie podłoże oraz warunki inkubacji (naczynia do hodowli komórkowych, wilgotne środowisko o zawartości CO_2 5 %, w stosownych przypadkach, oraz temperatura inkubacji w wysokości 37 °C). Linie komórkowe powinny być rutynowo sprawdzane pod kątem stabilności zmiennej liczby chromosomów oraz nieobecności zanieczyszczenia *mykoplazmą* (7) (19), a komórki nie powinny być wykorzystywane, jeżeli są zanieczyszczone lub w przypadku, gdy zmienna liczba chromosomów uległa zmianie. Należy ustalić normalny czas trwania cyklu komórkowego linii komórkowych lub pierwotnych kultur wykorzystywanych w laboratorium badawczym, który powinien być zgodny z opublikowanymi właściwościami komórek (20).

Przygotowanie kultur

Linie komórkowe: komórki są rozmnażane z kultur wyjściowych i wysiewane na podłoże w takiej gęstości, by komórki w zawiesinie lub w jednowarstwowej hodowli komórek mogły nadal rosnąć wykładniczo aż do czasu pobrania (np. należy unikać konfluencji w przypadku komórek rosnących w jednowarstwowej hodowli komórek).

▼M7

Limfocyty: krew pełną z antykoagulantem (np. heparyną) lub oddzielone limfocyty hoduje się (np. przez 48 godzin dla limfocytów ludzkich) w obecności mitogenu [np. fitohemaglutyniny (PHA) dla limfocytów ludzkich] w celu indukcji podziału komórek przed ich narażeniem na działanie badanej substancji chemicznej.

Aktywacja metaboliczna

Egzogenne układy metabolizujące należy stosować w przypadku, gdy stosuje się komórki o nieodpowiedniej endogennej wydolności metabolicznej. Najpowszechniej stosowanym układem, który jest domyślnie zalecany, jeżeli nie jest uzasadnione zastosowanie innego systemu, jest frakcja postmitochondrialna suplementowanego kofaktora (S9) przygotowywana z wątroby gryzoni (najczęściej szczurów) otrzymujących czynniki pobudzające enzymy takie jak Aroclor 1254 (21) (22) (23) lub kombinacja fenobarbitalu i β-naftoflawonu (24) (25) (26) (27) (28) (29). Ta ostatnia kombinacja nie pozostaje w sprzeczności z Konwencją sztokholmską w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych (30) i okazała się równie skuteczna jak Aroclor 1254 w wywoływaniu oksydaz wieloczynnościowych (24) (25) (26) (28). Frakcja S9 jest zazwyczaj wykorzystywana w stężeniach w zakresie 1–2 % (objętościowo), ale stężenie to może być zwiększone do 10 % (obj.) w końcowym podłożu użytym do badania. Podczas poddawania zwierzęcia czynnikom należy unikać stosowania produktów, które zmniejszają indeks mitotyczny, a zwłaszcza czynników wiążących wapń (31). Klasa badanych substancji chemicznej może mieć wpływ na wybór rodzaju i stężenia egzogennego układu metabolizującego lub czynnika pobudzającego metabolizm.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej

Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuścić w odpowiednich rozpuszczalnikach oraz rozcieńczyć, jeżeli jest to odpowiednie, przed poddaniem komórek ich działaniu (zob. pkt 23). Ciekłe substancje chemiczne można dodać do układu badawczego bezpośrednio lub rozcieńczyć przed podaniem do układu badawczego. Gazowe lub lotne substancje chemiczne należy badać za pomocą odpowiednich modyfikacji standardowych protokołów, takich jak poddawanie komórek działaniu substancji badanej w szczelnie zamkniętych naczyniach do hodowli komórkowych (32) (33) (34). Preparaty badanej substancji chemicznej należy przygotowywać tuż przed poddaniem komórek jej działaniu, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, iż dopuszczalne jest składowanie substancji.

Warunki badania

Rozpuszczalniki

Rozpuszczalnik należy wybrać tak, aby zoptymalizować rozpuszczalność badanych substancji chemicznych, unikając niepożądanego wpływu na przeprowadzenie badania, np. zmiany wzrostu komórek, wpływu na spójność badanej substancji chemicznej, reakcji z naczyniami do hodowli komórkowych czy zakłócenia układu metabolizującego. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć zastosowanie wodnego rozpuszczalnika (lub podłoża). Sprawdzonymi rozpuszczalnikami są woda lub sulfotlenek dimetylu. Zasadniczo zawartość rozpuszczalników organicznych nie powinna przekraczać 1 % (obj.) a zawartość rozpuszczalników wodnych (soli fizjologicznej lub wody) w końcowym podłożu użytym do badania nie powinna przekroczyć 10 % (obj.). Jeżeli używane są niesprawdzone rozpuszczalniki (np. etanol czy aceton), ich użycie powinno być uzasadnione danymi, które potwierdzają ich zgodność z badanymi substancjami chemicznymi, układem badawczym oraz brak toksyczności genetycznej w zastosowanym stężeniu. W razie braku takich danych potwierdzających należy uwzględnić próby kontrolne niepoddawane działaniu substancji (zob. dodatek 1) w celu wykazania, że wybrany rozpuszczalnik nie wywołuje skutków szkodliwych lub klastogennych.

Pomiar proliferacji komórek i cytotoksyczności oraz wybór badanych stężeń

Przy ustalaniu najwyższego stężenia badanej substancji chemicznej należy unikać stężeń, które mogą dawać zniekształcone wyniki dodatnie, np. stężeń powodujących nadmierną cytotoksyczność (zob. pkt 22), strącanie substancji w podłożu (zob. pkt 23) i znaczne zmiany pH lub osmolalności (zob. pkt 5). Jeżeli badana

▼M7

substancja chemiczna powoduje znaczną zmianę pH podłoża w momencie dodania, pH może zostać dopasowane poprzez buforowanie końcowego podłoża użytego do badania, aby uniknąć zniekształconych wyników dodatnich i utrzymać odpowiednie warunki hodowli.

Dokonuje się pomiaru proliferacji komórek, aby upewnić się, że odpowiednia liczba komórek poddanych działaniu substancji przeszła mitozę podczas testu oraz że substancja chemiczna jest podawana przy odpowiednim poziomie cytotoksyczności (zob. pkt 18 i 22). Cytotoksyczność powinna zostać określona w ramach głównego doświadczenia z użyciem aktywacji metabolicznej lub bez niej, przy wykorzystaniu odpowiedniego wskazania dotyczącego śmierci i wzrostu komórek. Chociaż ocena cytotoksyczności w badaniu wstępnym może być przydatna w lepszym określeniu stężeń, które mają zostać użyte w głównym doświadczeniu, badanie wstępne nie jest obowiązkowe. Jeżeli taka ocena zostanie przeprowadzona, nie może ona zastąpić pomiaru cytotoksyczności w głównym doświadczeniu.

Względne podwojenie populacji (RPD) lub względny wzrost liczby komórek (RICC) to odpowiednie metody oszacowania cytotoksyczności w badaniach cytogenetycznych (13) (15) (35) (36) (55) (zob. wzory w dodatku 2). W przypadku długoterminowego poddania działaniu substancji chemicznej i pobierania próbek po rozpoczęciu podawania substancji chemicznej w czasie dłuższym niż 1,5-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego (tj. w sumie dłużej niż 3-krotność czasu trwania cyklu komórkowego) RPD może prowadzić do niedoszacowania cytotoksyczności (37). W takich warunkach RICC może być lepszą miarą; pomocne oszacowanie z wykorzystaniem RPD może również zapewnić ocena cytotoksyczności po 1,5-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego.

W przypadku limfocytów z pierwotnych hodowli chociaż indeks mitotyczny jest miarą skutków cytotoksycznych/cytostatycznych, może mieć na niego wpływ czas po podaniu substancji chemicznej, wykorzystany mitogen i ewentualne zakłócenie cyklu komórkowego. Indeks mitotyczny jest jednak akceptowalny, ponieważ inne miary cytotoksyczności mogą być niewiarygodne i niepraktyczne oraz mogą nie mieć zastosowania do docelowej populacji limfocytów zwiększającej się w reakcji na stymulację PHA.

Chociaż RICC i RPD dla linii komórkowych i indeks mitotyczny pierwotnej hodowli limfocytów są zalecanymi parametrami cytotoksyczności, inne wskaźniki (np. integralność komórek, apoptoza, martwica, cykl komórkowy) mogą zapewnić przydatne informacje dodatkowe.

Należy ocenić co najmniej trzy badane stężenia (poza kontrolami z rozpuszczalnikiem i kontrolami dodatnimi), które spełniają kryteria dopuszczalności (odpowiednia cytotoksyczność, liczba komórek itp.). Bez względu na rodzaj komórek (linie komórkowe bądź pierwotne kultury limfocytów) przy każdym badanym stężeniu można stosować zarówno zduplikowane, jak i pojedyncze kultury poddane działaniu substancji. Mimo że zalecane jest stosowanie zduplikowanych kultur, dopuszczalne jest również stosowane pojedynczych kultur, pod warunkiem że policzono taką samą całkowitą liczbę komórek w przypadków zarówno kultur pojedynczych, jak i zduplikowanych. Zastosowanie pojedynczych kultur jest szczególnie uzasadnione, jeżeli ocenie poddaje się więcej niż 3 stężenia (zob. pkt 31). Wyniki uzyskane na podstawie niezależnych zduplikowanych kultur przy danym stężeniu można łączyć na potrzeby analizy danych (38). W przypadku badanych substancji chemicznych wykazujących niewielką cytotoksyczność lub niewykazujących żadnej cytotoksyczności na ogół odpowiednie będzie zastosowanie 2–3-krotnych przedziałów stężenia. W przypadku wystąpienia cytotoksyczności wybrane badane stężenia powinny obejmować zakres rozpoczynający się od stężenia, które wykazuje cytotoksyczność, jak opisano w pkt 22, oraz uwzględniający stężenia, w których wystąpiła umiarkowana i niewielka cytotoksyczność lub nie wystąpiła żadna cytotoksyczność. Wiele badanych substancji

▼M7

chemicznych wykazuje gwałtowny wzrost krzywych stężenie-odpowiedź, w związku z czym aby uzyskać dane przy niskiej i umiarkowanej cytotoksyczności lub aby szczegółowo zbadać zależność dawka-odpowiedź, konieczne będzie zastosowanie stężeń o bardziej zbliżonych wartościach lub więcej niż trzech stężeń (kultury pojedyncze lub zduplikowane), w szczególności w sytuacjach, w których wymagane jest powtórzenie doświadczenia (zob. pkt 47).

Jeżeli maksymalne stężenie opiera się na cytotoksyczności, najwyższe stężenie powinno dążyć do osiągnięcia cytotoksyczności na poziomie 55 ± 5 % przy wykorzystaniu zalecanych parametrów cytotoksyczności (tj. zmniejszenie RICC i RPD dla linii komórkowych i zmniejszenie indeksu mitotycznego pierwotnych hodowli limfocytów do poziomu 45 ± 5 % jednoczesnej kontroli ujemnej). Należy zachować ostrożność w interpretowaniu wyników dodatnich, które wystąpiły wyłącznie w górnym przedziale tego zakresu cytotoksyczności 55 ± 5 % (13).

Dla słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych, które nie wykazują cytotoksyczności w stężeniach niższych od najniższego stężenia nierozpuszczalnego, najwyższe badane stężenie powinno spowodować mętność lub osad widoczny gołym okiem lub przez mikroskop w układzie odwróconym pod koniec podawania badanej substancji chemicznej. Nawet jeżeli cytotoksyczność wystąpi dla stężeń powyżej najniższego stężenia nierozpuszczalnego, zaleca się przeprowadzenie testu tylko dla jednego stężenia powodującego mętność bądź wytrącenie się widocznego osadu, ponieważ osad może spowodować pojawienie się wyników zniekształconych. W przypadku stężenia powodującego powstanie osadu należy zadbać o to, aby pojawienie się osadu nie zakłóciło przebiegu testu (np. barwienia lub oceny). Pomocne może się okazać określenie rozpuszczalności podłoża przed wykonaniem doświadczenia.

Jeżeli nie zaobserwowano żadnego osadu ani ograniczenia cytotoksyczności, najwyższe badane stężenie powinno odpowiadać 10 mM, 2 mg/ml lub 2 µl/ml w zależności od tego, która z tych wartości jest najniższa (39) (40) (41). Jeżeli badana substancja chemiczna nie ma określonego składu, np. substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne (UVCB) (42), wyciągi pochodzące ze środowiska itp., może być konieczne podwyższenie (np. do 5 mg/ml) najwyższego stężenia w przypadku braku dostatecznej cytotoksyczności, tak aby zwiększyć stężenie każdego ze składników. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że wymagania te mogą się różnić w przypadku produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi (43).

Kontrole

Dla każdego czasu pobrania należy włączyć jednoczesną kontrolę ujemną (zob. pkt 15), obejmującą sam rozpuszczalnik w podłożu użytym do badania, w ramach której test przeprowadza się w identyczny sposób, jak w przypadku kultur poddanych działaniu substancji.

Jednoczesna kontrola dodatnia jest konieczna, aby wykazać zdolność laboratorium do zidentyfikowania klastogenów w warunkach określonych w stosowanym protokole badania oraz skuteczność egzogennego układu metabolizującego, w stosownych przypadkach. Przykładowe substancje służące do kontroli dodatniej są przedstawione poniżej w tabeli 1. W uzasadnionych przypadkach dopuszcza się zastosowanie alternatywnych substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej. Ponieważ testy na komórkach ssaków *in vitro* pod kątem toksyczności genetycznej są w dostatecznym stopniu ustandaryzowane, zastosowanie kontroli dodatniej można ograniczyć do klastogenu wymagającego aktywacji metabolicznej. W tym przypadku pojedyncza reakcja klastogenna w ramach kontroli dodatniej wykaże zarówno aktywność układu metabolizującego, jak i reaktywność układu badawczego, pod warunkiem że odbywa się jednocześnie z nieaktywowanym testem o takim samym czasie podawania badanej substancji. W przypadku długoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej (bez S9) należy zastosować jednak oddzielną kontrolę dodatnią, ponieważ czas podawania badanej substancji chemicznej będzie się różnił od czasu w badaniu z wykorzystaniem aktywacji metabolicznej. Każdą kontrolę dodatnią należy zastosować przy co najmniej jednym stężeniu, od którego oczekuje się wytworzenia odtwarzalnego oraz wykrywalnego wzrostu wykraczającego poza poziom wyjściowy, w celu wykazania czułości układu badawczego (tj. efekty są jasne, ale nie ujawniają badającemu bezpośrednio tożsamości zakodowanych szkiełek mikroskopowych), a reakcja nie powinna być zakłócona cytotoksycznością wykraczającą poza limity określone w niniejszej metodzie badawczej.

▼M7

Tabela 1

Chemiczne substancje odniesienia zalecane do oceny biegłości laboratorium oraz do wyboru substancji do kontroli dodatniej

Kategoria	Substancja chemiczna	Numer CAS
1. Klastogeny aktywne bez aktywacji metabolicznej		
	Metanosulfonian metylu	66-27-3
	Mitomycyna C	50-07-7
	N-tlenek 4-nitrochinoliny	56-57-5
	Arabinozyd cytozyny	147-94-4
2. Klastogeny wymagające aktywacji metabolicznej		
	Benzo[a]piren	50-32-8
	Cyklofosfamid	50-18-0

PROCEDURA

Poddanie działaniu substancji chemicznej

Rozmnażające się komórki są poddawane działaniu badanej substancji chemicznej w obecności układu metabolizującego oraz przy jego braku.

Czas pobrania kultury komórkowej

W celu gruntownej oceny, która jest niezbędna do potwierdzenia wyniku ujemnego, należy przeprowadzić doświadczenie we wszystkich trzech następujących warunkach z zastosowaniem krótkoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej z aktywacją metaboliczną i bez niej oraz długoterminowego poddawania działaniu substancji bez aktywacji metabolicznej (zob. pkt 43, 44 i 45):

— komórki należy poddawać działaniu badanej substancji chemicznej bez aktywacji metabolicznej przez 3–6 godzin, a następnie należy pobrać próbki w czasie równoważnym około 1,5-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji (18);

— komórki należy poddawać działaniu badanej substancji chemicznej z użyciem aktywacji metabolicznej przez 3–6 godzin, a następnie należy pobrać próbki w czasie równoważnym około 1,5–2-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji (18);

— komórki powinny być nieprzerwanie poddawane działaniu badanej substancji chemicznej bez aktywacji metabolicznej aż do pobrania próbek w czasie równoważnym około 1,5-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego. Niektóre substancje chemiczne (np. analogi nukleozydowe) mogą być łatwiej wykryte w okresie podawania substancji chemicznej/pobierania próbek, który jest dłuższy niż 1,5-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego (24).

Jeżeli którekolwiek z powyższych warunków doświadczalnych wywołały reakcję dodatnią, badanie któregokolwiek z pozostałych schematów poddawania działaniu substancji chemicznej może okazać się zbędne.

Przygotowanie chromosomów

Kultury komórkowe są poddawane działaniu colcemidu lub kolchicyny zazwyczaj przez 1–3 godzin przed pobraniem komórek. Każda kultura komórkowa jest pobierana oraz poddawana działaniu substancji oddzielnie w celu przygotowania chromosomów. Przygotowanie chromosomów obejmuje hipotoniczne poddawanie komórek działaniu substancji chemicznej, utrwalanie oraz wybarwianie. Po upływie 3–6-godzin poddawania działaniu substancji w jednowarstwowych hodowlach komórek mogą być obecne komórki mitotyczne (można je rozpoznać po okrągłym kształcie i fakcie, że oddzielają się od powierzchni).

▼M7

Z uwagi na łatwość oddzielania się komórek mitotycznych można je utracić w momencie usuwania podłoża zawierającego badaną substancję chemiczną. Jeżeli istnieją dowody na znaczny wzrost liczby komórek mitotycznych w porównaniu z próbami kontrolnymi, co wskazuje na prawdopodobieństwo zatrzymania mitozy, należy zebrać komórki poprzez odwirowanie i dodać je z powrotem do hodowli, aby w czasie poboru uniknąć utraty komórek będących w fazie mitozy i zagrożonych aberracją chromosomową.

Analiza

Wszystkie preparaty, w tym te stanowiące kontrolę dodatnią i ujemną, należy niezależnie zakodować przed przeprowadzeniem analizy mikroskopowej aberracji chromosomowych. Ze względu na fakt, że procedury utrwalania często skutkują odsetkiem komórek w metafazie, które utraciły chromosomy, zliczone komórki powinny zatem zawierać liczbę centromerów równą liczbie modalnej +/-2.

Należy ocenić co najmniej 300 dobrze rozciągniętych metafaz na stężenie oraz grupę kontrolną, aby uznać, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny (zob. pkt 45). Wspomniane 300 komórek należy równo podzielić między kontrpróby w przypadku wykorzystania zduplikowanych kultur. W przypadku stosowania pojedynczych kultur na każde stężenie (zob. pkt 21) w takiej pojedynczej kulturze należy ocenić co najmniej 300 dobrze rozciągniętych metafaz. Ocena 300 komórek przynosi korzyść w postaci zwiększenia mocy statystycznej testu, a ponadto rzadko obserwowane są wartości zerowe (oczekuje się zaledwie 5 %) (44). Liczbę zliczanych metafaz można zmniejszyć w przypadku odnotowania dużej liczby komórek z aberracjami chromosomowymi oraz w przypadku uznania badanej substancji chemicznej za dającą wynik wyraźnie dodatni.

Należy ocenić ilościowo komórki ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi, z uwzględnieniem lub z pominięciem przerw. Terminy „złamanie” i „przerwa” są zdefiniowane w dodatku 1 zgodnie z (45) (46). Aberracje typu chromatydowego i chromosomowego należy odnotowywać oddzielnie i klasyfikować według podtypów (złamania, wymiany). Procedury stosowane w laboratorium powinny zapewniać przeprowadzanie analizy aberracji chromosomowych przez odpowiednio przeszkolonych pracowników odpowiadających za zliczanie oraz – w stosownych przypadkach – poddanie wyników tej analizy wzajemnej ocenie.

Mimo że badanie przeprowadza się w celu wykrycia strukturalnych aberracji chromosomowych, należy pamiętać o konieczności odnotowywania częstości występowania poliploidalności i endoreduplikacji, jeżeli zaobserwowano wystąpienie tych zjawisk. (Zob. pkt 2).

Biegłość laboratorium

Aby ustalić wystarczające doświadczenie laboratorium w zakresie omawianego testu przed zastosowaniem go w rutynowych badaniach, laboratorium powinno wcześniej przeprowadzić szereg doświadczeń z wykorzystaniem substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej, działających za pomocą różnych mechanizmów i różnych kontroli ujemnych (z wykorzystaniem różnych rozpuszczalników/nośników). Reakcje otrzymane w wyniku takiej kontroli dodatniej i ujemnej powinny odpowiadać reakcjom opisanym w literaturze. Nie dotyczy to laboratoriów, które dysponują odpowiednim doświadczeniem, tj. laboratoriów prowadzących bazę danych historycznych, o której mowa w pkt 37.

Aby wykazać biegłość w zakresie wykrywania klastogennych substancji chemicznych i określić skuteczność układu metabolizującego, należy zbadać szereg substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej (zob. tabela 1 w pkt 26) przy krótkoterminowym i długoterminowym poddawaniu działaniu substancji chemicznej przy braku aktywacji metabolicznej oraz przy krótkoterminowym poddawaniu działaniu substancji chemicznej w obecności aktywacji metabolicznej. Należy dobrać szereg stężeń wybranych substancji chemicznych, tak aby uzyskać powtarzalne i powiązane ze stężeniem wzrosty wykraczające poza poziom wyjściowy w celu wykazania czułości i zakresu oznaczania układu badawczego.

▼M7

Dane historyczne dotyczące kontroli

Laboratorium powinno ustalić:

— zakres i rozkład historycznych wyników kontroli dodatniej,

— zakres i rozkład historycznych wyników kontroli ujemnej (bez poddania działaniu substancji chemicznej, z rozpuszczalnikiem).

Przy pierwszym gromadzeniu danych dotyczących rozkładu historycznych wyników kontroli ujemnej wyniki jednoczesnej kontroli ujemnej powinny być zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli, o ile takie dane istnieją. W miarę dodawania kolejnych danych doświadczalnych do rozkładu kontroli jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla tego rozkładu (44) (47). Prowadzona przez dane laboratorium baza danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej powinna wyjściowo zawierać dane z co najmniej 10 doświadczeń, a najlepiej z co najmniej 20 doświadczeń przeprowadzonych w porównywalnych warunkach doświadczalnych. Laboratoria powinny stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (48)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych dotyczących kontroli dodatniej i ujemnej oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest „pod kontrolą” (44). Dalsze zalecenia dotyczące sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych (tj. kryteria włączania danych do zbioru danych historycznych i wykluczania danych z tego zbioru oraz kryteria dopuszczalności dla danego doświadczenia) można znaleźć w literaturze (47).

Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem ich spójności z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wszelkie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli.

Dane dotyczące kontroli ujemnej powinny obejmować częstość występowania komórek z aberracjami chromosomowymi w pojedynczej kulturze lub w ramach sumy zduplikowanych kultur, jak opisano w pkt 21. Jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla rozkładu danych zawartych w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (44) (47). W przypadku gdy dane dotyczące jednoczesnej kontroli ujemnej znajdują się poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 %, włączenie ich do rozkładu kontroli historycznej może być dopuszczalne, pod warunkiem że dane te nie stanowią skrajnych obserwacji nietypowych oraz że istnieją dowody świadczące o tym, iż dany układ badawczy znajduje się „pod kontrolą” (zob. pkt 37), a także dowody wykluczające błąd techniczny czy ludzki.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Przedstawienie wyników

Należy ocenić ilościowo odsetek komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi. Aberracje typu chromosomowego i chromatydowego sklasyfikowane według podtypów (złamania, wymiany) należy wyszczególnić oddzielnie, podając ich liczbę i częstość występowania w kulturach doświadczalnych i kontrolnych. Przerwy odnotowuje się i zgłasza odrębnie, przy czym nie bierze się ich pod uwagę przy ustalaniu ogólnej częstości występowania aberracji. Odsetek komórek, w których odnotowano poliploidalność lub endoreduplikację, zgłasza się, jeżeli zostaną zaobserwowane.

Należy odnotowywać jednoczesne pomiary cytotoksyczności w odniesieniu do wszystkich kultur poddanych działaniu substancji chemicznej, kultur kontroli ujemnej i kultur kontroli dodatniej w ramach głównego doświadczenia lub głównych doświadczeń aberracji.

Należy dostarczyć dane dotyczące poszczególnych kultur. Dodatkowo wszystkie dane należy podsumować w postaci tabeli.

Kryteria dopuszczalności

Dopuszczalność testu ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

— uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących jednoczesnej kontroli ujemnej do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej, jak opisano w pkt 39;

▼M7

— jednoczesne kontrole dodatnie (zob. pkt 26) powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną;

— kryteria proliferacji komórek w kontroli z rozpuszczalnikiem powinny zostać spełnione (pkt 17 i 18);

— zbadano wszystkie warunki doświadczalne do momentu uzyskania w jednych z nich wyników dodatnich (zob. pkt 28);

— można poddać analizie wystarczającą liczbę komórek i stężeń (pkt 31 i 21);

— kryteria wyboru najwyższego stężenia są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 22, 23 i 24.

Ocena i interpretacja wyników

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli w dowolnych ze zbadanych warunków doświadczalnych (zob. pkt 28):

a) co najmniej jedno z badanych stężeń wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,

b) ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany z dawką,

c) którykolwiek wynik znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 39).

W przypadku gdy wszystkie wspomniane kryteria są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna jest w stanie wywołać aberracje chromosomowe w kulturze komórek ssaków w danym układzie badawczym. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można znaleźć w literaturze (49) (50) (51).

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych (zob. pkt 28):

a) żadne z badanych stężeń nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,

b) ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany ze stężeniem,

c) wszystkie wyniki mieszczą się w rozkładzie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 39).

Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za niezdolną do wywołania aberracji chromosomowych w kulturze komórek ssaków w danym układzie badawczym.

Weryfikacja wyraźnie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

Jeżeli reakcja nie jest ani wyraźnie ujemna, ani wyraźnie dodatnia, jak opisano powyżej, oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku, dane powinny zostać ocenione na podstawie opinii eksperta lub wyników dalszych badań. Przydatna może być ocena dodatkowych komórek (w stosownych przypadkach) lub powtórne przeprowadzenie doświadczenia, potencjalnie z zastosowaniem zmienionych warunków doświadczalnych (np. odstępów czasu między stężeniami, innych warunków aktywacji metabolicznej (tj. stężenie S9 lub pochodzenie S9)).

W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne i w takiej sytuacji reakcja badanej substancji chemicznej zostanie uznana za niejednoznaczną.

▼M7

Wzrost liczby komórek poliploidalnych może świadczyć o tym, że badane substancje chemiczne mogą potencjalnie hamować procesy mitotyczne oraz indukować aberracje liczby chromosomów (52). Wzrost liczby komórek z endoreduplikowanymi chromosomami może świadczyć o tym, że badane substancje chemiczne mogą potencjalnie hamować przebieg cyklu komórkowego (53) (54) (zob. pkt 2). Dlatego też częstość występowania komórek poliploidalnych i komórek z endoreduplikowanymi chromosomami należy odnotowywać oddzielnie.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— źródło, numer partii, data graniczna do użytku, jeżeli jest dostępna;

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;

— rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane;

— pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, w stosownych przypadkach.

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy systematycznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Rozpuszczalnik:

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika,

— należy wskazać również zawartość procentową rozpuszczalnika w końcowym podłożu.

Komórki:

— rodzaj i źródło komórek;

— cechy kariotypu oraz odpowiedniość wykorzystywanych rodzajów komórek;

— nieobecność mykoplazmy w przypadku linii komórkowych;

— w przypadku linii komórkowych – informacje na temat czasu trwania cyklu komórkowego, czasu podwojenia lub wskaźnika proliferacji;

— płeć, wiek i wszelkie inne istotne informacje na temat dawców krwi, krew pełna lub oddzielone limfocyty, wykorzystany mitogen;

— w przypadku linii komórkowych – liczba pasaży, o ile informacje na ten temat są dostępne;

— w przypadku linii komórkowych – metody utrzymania kultur komórkowych;

— w przypadku linii komórkowych – modalna liczba chromosomów.

▼M7

Warunki badania:

— nazwa substancji chemicznej zatrzymującej metafazę, jej stężenie oraz okres narażenia komórek na działanie tej substancji;

— stężenie badanej substancji chemicznej wyrażone jako stężenie końcowe w podłożu (np. µg lub mg/mL lub mM podłoża);

— uzasadnienie wyboru stężeń oraz liczby kultur, z uwzględnieniem np. danych dotyczących cytotoksyczności oraz granic rozpuszczalności;

— skład podłoża, w stosownych przypadkach stężenie CO_2, poziom wilgotności;

— stężenie (lub objętość) rozpuszczalnika i badanej substancji chemicznej dodanych do podłoża;

— temperatura inkubacji;

— czas inkubacji;

— czas poddawania działaniu substancji chemicznej;

— czas pobrania po podaniu substancji chemicznej;

— w stosownych przypadkach zagęszczenie komórek w czasie osadzania;

— typ oraz skład układu metabolizującego (źródło frakcji S9, metoda przygotowania preparatu frakcji S9, stężenie lub objętość preparatu frakcji S9 i frakcji S9 w końcowym podłożu, kontrole jakości frakcji S9);

— substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej i ujemnej, stężenia końcowe w poszczególnych warunkach poddawania działaniu substancji chemicznej;

— metody przygotowywania preparatów oraz stosowane techniki barwienia;

— kryteria dopuszczalności metod oznaczania zawartości;

— kryteria oceny aberracji;

— liczba przeanalizowanych metafaz;

— metody pomiaru cytotoksyczności;

— wszelkie informacje uzupełniające istotne w kontekście cytotoksyczności i stosowanej metody;

— kryteria uznawania wyników badań za dodatnie, ujemne lub niejednoznaczne;

— metody stosowane w celu ustalenia poziomu pH, osmolalności i strącania.

Wyniki:

— liczba komórek poddanych działaniu substancji chemicznej i liczba komórek pobranych z każdej kultury w przypadku zastosowania linii komórkowych;

— wyniki pomiaru cytotoksyczności, np. RPD, RICC, indeks mitotyczny, ewentualne inne obserwacje;

— w przypadku linii komórkowych – informacje na temat czasu trwania cyklu komórkowego, czasu podwojenia lub wskaźnika proliferacji;

— oznaki strącania i czas oznaczenia;

▼M7

— definicja aberracji, w tym przerw;

— liczba ocenionych komórek, liczba komórek z aberracjami chromosomowymi i rodzaj aberracji chromosomowych podany osobno dla każdej hodowli poddanej działaniu substancji chemicznej i dla każdej hodowli kontrolnej, z uwzględnieniem i z pominięciem przerw;

— zmiany ploidalności (podane osobno dla komórek poliploidalnych i dla komórek z endoreduplikowanymi chromosomami), jeżeli zaobserwowano takie zmiany;

— w stosownych przypadkach zależność stężenie-odpowiedź;

— dane dotyczące jednoczesnych kontroli ujemnych (rozpuszczalnik) i dodatnich (stężenia i rozpuszczalniki);

— dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej (z rozpuszczalnikiem) i dodatniej wraz z zakresami, średnimi oraz odchyleniami standardowymi oraz granice kontrolne wyznaczające przedział 95 % dla rozkładu, uwzględniając ilość danych;

— analizy statystyczne, ewentualne p-wartości.

Omówienie wyników.

Wnioski.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, „Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015”, Publikacje OECD na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny, nr 234, OECD, Paryż.

(2) Evans, H.J. (1976), „Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens”, w: *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, t. 4, Hollaender, A. (red.), Plenum Press, Nowy Jork i Londyn, s. 1–29.

(3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, w: *Progress in Mutation Research*, t. 5, Ashby, J. *et al.* (red.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-Nowy Jork-Oksford, s. 427–432.

(4) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosomal abberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 10 / suplement 10, s. 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*, t. 49/4, s. 318–327.

(6) Rozdział B.49 niniejszego załącznika: *Test mikrojądrowy na komórkach ssaków in vitro.*

(7) Opracowanie ILSI (projekt), 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. Sprawozdanie 9. grupy zadaniowej ICMPEMC, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, t. 257/2, s. 147–204.

(9) Morita, T. *et al.* (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 268/2, s. 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 Mutagen*esis, t. 8/6, s. 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,* t. 634/1–2, s. 177–183.

(12) Nesslany, F. *et al.* (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 49/6, s. 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*, t. 35/3, s. 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*, t. 584/1–2, s. 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*, t. 43/1, s. 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*, t. 31/4, s. 316–326.

(17) Hedner K. *et al.* (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, t. 62, s. 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*, t. 338, s. 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*, t. 33/3, s. 261–287.

(20) Henderson, L. *et al.* (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, t. 12/3, s. 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*, t. 31/6, s. 347–363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, t. 113/3–4, s. 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 Res*earch, t. 37/1, s. 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*, t. 66/3, s. 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,* t. 4/1, s. 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*, t. 7/3, s. 175–177.

▼**M7**

(27) Matsushima, T. *et al.* (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", w *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (red.), Elsevier, North-Holland, s. 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*, t. 312/3, s. 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,* t. 28/1, s. 51–59.

(30) UNEP (2001), Konwencja sztokholmska w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych, Program Narodów Zjednoczonych ds. Ochrony Środowiska (UNEP). Dostępny na stronie internetowej: 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*, t. 190/3, s. 225–8.

(32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", w: *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (red.), Plenum, Nowy Jork, s. 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*, t. 5/6, s. 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*, t. 652/2, s. 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, t. 655/1-2, s. 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*, t. 723/2, s. 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*, t. 724/1-2, s. 86–87.

(38) Richardson, C. *et al.* (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. W: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (red.) Cambridge University Press, Cambridge, s. 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 (wytyczne dotyczące badań 473, 476 i 487) ENV/JM/TG(2014)17. Dostępny na wniosek.

(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*, t. 741/1-2, s. 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. In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis,* t. 54/1, s. 36–43.

▼**M7**

(42) EPA, Urząd ds. Bezpieczeństwa Substancji Chemicznych i Zapobiegania Zanieczyszczeniom (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.

(43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Dostępny na stronie internetowej: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines", Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 198, OECD Publishing, Paryż.

(45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (red.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. *et al.* (1990), Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*, w:*Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 62–86.

(47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, t. 723/2, s. 87–90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* wyd. II, John Wiley and Sons, Nowy Jork.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, wyd. III, John Wiley & Sons, Nowy Jork.

(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*, t. 10 / suplement 10, s. 1–175.

(51) Richardson, C. *et al.* (1989), „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays", w *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 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*, t. 287/1, s. 29–46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, t. 119/3, s. 403–413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, t. 43/3, s. 1362–1364.

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, t. 312, s. 139–149.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICJE

Aneuploidia: wszelkie odchylenia od zwykłej diploidalnej (lub haploidalnej) liczby chromosomów w pojedynczym chromosomie lub w większej ich liczbie, ale nie w całym zestawie czy całych zestawach chromosomów (poliploidalność).

Apoptoza: zaprogramowana śmierć komórki, na którą składa się szereg etapów prowadzących do rozpadu komórek w cząstki otoczone błoną, które są następnie eliminowane przez fagocytozę lub wydalanie.

Proliferacja komórek: wzrost liczby komórek w wyniku mitotycznego podziału komórek.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Złamanie chromatydowe: przerwanie ciągłości pojedynczej chromatydy, w której wyraźnie doszło do wypaczenia jednej z chromatyd.

Przerwa chromatydowa: niebarwiący obszar (achromatyczne uszkodzenie) pojedynczej chromatydy, w którym doszło do nieznacznego wypaczenia chromatydy.

Aberracja typu chromatydowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu wyrażone jako złamanie pojedynczych chromatyd lub złamanie i ponowne połączenie się chromatyd.

Aberracja typu chromosomowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu wyrażone jako złamanie chromatyd lub złamanie i ponowne połączenie się obu chromatyd w tym samym miejscu.

Klastogen: każda substancja chemiczna, która powoduje strukturalne aberracje chromosomowe w populacjach komórek lub organizmów eukariotycznych.

Stężenia: oznaczają stężenia końcowe badanej substancji chemicznej w podłożu.

Cytotoksyczność: w odniesieniu do badań objętych niniejszą metodą badawczą przeprowadzanych z wykorzystaniem linii komórkowych cytotoksyczność określa się jako obniżenie względnego podwojenia populacji (RPD) lub obniżenie względnego wzrostu liczby komórek (RICC) komórek poddanych działaniu substancji w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 17 i dodatek 2). W odniesieniu do badań objętych niniejszą metodą badawczą przeprowadzanych z wykorzystaniem pierwotnych kultur limfocytów cytotoksyczność określa się jako obniżenie indeksu mitotycznego (MI) komórek poddanych działaniu substancji w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 18 i dodatek 2).

Endoreduplikacja: proces, w którym po fazie S replikacji DNA jądro komórkowe nie wchodzi w fazę mitozy, lecz rozpoczyna się kolejna faza S. Wynikiem są chromosomy o 4, 8, 16, ... chromatydach.

Genotoksyczny: ogólny termin odnoszący się do wszelkiego rodzaju uszkodzeń DNA lub chromosomu, w tym złamań, delecji, adduktów, modyfikacji i sprzężeń nukleotydów, rearanżacji, mutacji genowych, aberracji chromosomowych oraz aneuploidii. Nie wszystkie rodzaje efektów genotoksycznych powodują mutacje lub stałe uszkodzenia chromosomu.

Indeks mitotyczny (MI): stosunek liczby komórek w metafazie do całkowitej liczby komórek zaobserwowanych w populacji komórek; wskazanie stopnia proliferacji tej populacji.

Mitoza: podział jądra komórkowego, na który zazwyczaj składają się profaza, prometafaza, metafaza, anafaza i telofaza.

Mutagenny: tworzący dziedziczne zmiany w sekwencji lub sekwencjach par zasad DNA w genach lub w strukturze chromosomów (aberracje chromosomowe).

▼M7

Aberracja liczby: zmiana liczby chromosomów względem standardowej liczby chromosomów typowej dla wykorzystywanych komórek.

Poliploidalność: aberracje liczby chromosomów w komórkach lub organizmach, obejmujące cały zestaw lub zestawy chromosomów, a nie pojedynczy chromosom lub chromosomy (aneuploidia).

Status p53: białko p53 bierze udział w procesie regulacji cyklu komórkowego, apoptozy i naprawy DNA. Komórki, w których odnotowuje się niedobór białka p53 i które są niezdolne do zatrzymania cyklu komórkowego lub do usunięcia uszkodzonych komórek poprzez apoptozę lub inne mechanizmy (np. poprzez zainicjowanie procesu naprawy DNA) powiązane z funkcjami, jakie białko p53 pełni w reakcji na uszkodzenie DNA, powinny teoretycznie być bardziej podatne na mutacje genowe lub aberracje chromosomowe.

Względny wzrost liczby komórek (RICC): wzrost liczby komórek w kulturach poddanych działaniu substancji chemicznej w zestawieniu ze wzrostem liczby komórek w kulturach, które nie zostały poddane działaniu substancji chemicznej, wyrażony jako odsetek.

Względne podwojenie populacji (RPD): wzrost liczby podwojeń populacji w kulturach poddanych działaniu substancji chemicznej w zestawieniu ze wzrostem liczby komórek w kulturach, które nie zostały poddane działaniu substancji chemicznej, wyrażony jako odsetek.

Frakcja S9 uzyskana z wątroby: supernatant z homogenatu wątroby po odwirowaniu przy 9 000 g, tj. surowy ekstrakt z wątroby.

Preparat frakcji S9: preparat złożony z frakcji S9 uzyskanej z wątroby i kofaktorów niezbędnych do aktywności metabolicznej enzymów.

Kontrola z rozpuszczalnikiem: ogólny termin opisujący kultury kontrolne otrzymujące wyłącznie rozpuszczalnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej.

Strukturalna aberracja chromosomowa: zmiana w strukturze chromosomu wykrywalna przez badanie mikroskopowe etapu metafazy w cyklu podziału komórki, zaobserwowana jako delecje, fragmenty, zmiany zachodzące między chromosomami lub w obrębie chromosomu.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Próby kontrolne niepoddawane działaniu substancji: hodowle, które nie są poddawane działaniu żadnej substancji (tj. badanej substancji chemicznej ani rozpuszczalnika), lecz które są równolegle przetwarzane w taki sam sposób jako hodowle otrzymujące badaną substancję chemiczną.

▼M7

Dodatek 2

WZORY DO OCENY CYTOTOKSYCZNOŚCI

Indeks mitotyczny:

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{liczba komórek mitotycznych}}{\text{całkowita liczba zliczonych komórek}} \times 100$$

Zaleca się korzystanie ze wskaźnika **względnego wzrostu liczby komórek (RICC)** lub **względnego podwojenia populacji (RPD)**, ponieważ oba te wskaźniki uwzględniają odsetek populacji komórek, które uległy podziałowi.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{wzrost l. Kom. Whodowlach poddanych działaniu subst. chem.(l. końcawa} - \text{l. początkowa}))}{(\text{wzrost liczby komórek whodowlach kontrolnych(l. końcawa} - \text{l. początkowa}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{liczba podowjeń populacji wkulturach poddanych działaniu substanchi chemicznej})}{(\text{liczba podowjeń populacji wkulturach kontroknych})} \times 100$$

gdzie:

Podwojenie populacji = [log (liczba komórek po poddaniu działaniu substancji chemicznej ÷ początkowa liczba komórek)] ÷ log 2

Na przykład RICC lub RPD wynoszący 53 % oznacza, że cytotoksyczność/cytostazę na poziomie 47 %, natomiast cytotoksyczność/cytostaza na poziomie 55 % mierzona za pomocą indeksu mitotycznego oznacza, że faktyczny indeks mitotyczny wynosi 45 % wartości dla grupy kontrolnej.

W każdym razie należy ustalić liczbę komórek przed poddaniem działaniu substancji chemicznej, przy czym liczba ta powinna być taka sama zarówno w przypadku hodowli poddanych działaniu substancji chemicznej, jak i w przypadku hodowli na potrzeby kontroli ujemnej.

Chociaż wskaźnik RCC (tj. liczba komórek w hodowlach poddanych działaniu substancji chemicznej podzielona przez liczbę komórek w hodowlach kontrolnych) był w przeszłości wykorzystywany jako parametr cytotoksyczności, nie zaleca się dalszego korzystania z tego wskaźnika, ponieważ może to skutkować niedoszacowaniem cytotoksyczności.

W przypadku hodowli na potrzeby kontroli ujemnej przy podwajaniu populacji należy zachować zgodność z wymogiem pobierania próbek komórek po poddaniu ich działaniu substancji chemicznej w czasie równoważnym około 1,5-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego, przy czym wartość indeksu mitotycznego powinna być na tyle wysoka, aby zapewnić dostateczną liczbę komórek na etapie mitozy i zagwarantować możliwość wiarygodnego wyliczenia wartości 50-procentowej redukcji.”;

▼M7

B.11. TEST ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH NA SZPIKU KOSTNYM SSAKÓW

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 475 (2016). Stanowi ona część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. Opracowany został dokument OECD, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd ostatnich zmian, jakie wprowadzono do wytycznych dotyczących badań (1).

Test aberracji chromosomowej na szpiku kostnym ssaków *in vivo* ma szczególne znaczenie dla oceny genotoksyczności, ponieważ czynniki związane z metabolizmem, farmakokinetyką oraz procesami naprawy DNA *in vivo* – choć mogą różnić się w zależności od gatunku – są aktywne i wywierają wpływ na reakcje. Przeprowadzenie testu *in vivo* jest również przydatne do celów dalszego badania genotoksyczności stwierdzonej w układzie *in vitro*.

Test aberracji chromosomowej na szpiku kostnym ssaków *in vivo* przeprowadza się w celu wykrycia strukturalnych aberracji chromosomowych indukowanych badanymi substancjami chemicznymi w komórkach szpiku kostnego zwierząt, zazwyczaj gryzoni (2) (3) (4) (5). Strukturalne aberracje chromosomowe mogą występować w dwóch typach – chromosomowym lub chromatydowym. Choć większość genotoksycznych aberracji indukowanych substancjami chemicznymi ma postać aberracji typu chromatydowego, niekiedy występują również aberracje typu chromosomowego. Aberracje chromosomowe i powiązane z nimi zdarzenia są przyczyną wielu ludzkich chorób genetycznych, a także istnieją istotne dowody wskazujące, że tego rodzaju zmiany patologiczne i powiązane z nimi zdarzenia powodują zmiany w onkogenach oraz w antyonkogenach i przyczyniają się do powstawania zmian nowotworowych u ludzi oraz w układach doświadczalnych. W trakcie przeprowadzania testów aberracji chromosomowych *in vivo* może wystąpić poliploidalność (w tym endoreduplikacja). Sam fakt wzrostu poliploidalności nie musi jednak świadczyć o właściwościach aneugenicznych i może stanowić po prostu skutek zaburzenia cyklu komórkowego lub cytotoksyczności. Celem niniejszego testu nie jest pomiar aneuploidii. Testy *in vivo* i *in vitro* zalecane do wykrywania aneuploidii to, odpowiednio, test mikrojądrowy na erytrocytach ssaków *in vivo* (rozdział B.12 niniejszego załącznika) lub test mikrojądrowy na komórkach ssaków *in vitro* (rozdział B.49 niniejszego załącznika).

Definicje stosowanych terminów zamieszczono w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

Chociaż niniejszy test przeprowadza się zazwyczaj na gryzoniach, w niektórych przypadkach dopuszcza się również możliwość wykorzystania innych gatunków, jeżeli zostanie to naukowo uzasadnione. Tkanką docelową w tym teście jest szpik kostny, ponieważ jest on wysoce unaczynioną tkanką zawierającą populację komórek o szybkim cyklu podziału, które można w łatwy sposób wyizolować i poddać działaniu substancji chemicznej. W sprawozdaniu powinno się przedstawić naukowe uzasadnienie wykorzystania gatunków innych niż szczury i myszy. W przypadku wykorzystywania zwierząt innych niż gryzonie zaleca się włączenie pomiaru aberracji chromosomowych w szpiku kostnym do innego stosownego badania toksyczności.

Jeżeli istnieją dowody świadczące o tym, że badana(-e) substancja(-e) chemiczna(-e) lub jej (ich) metabolit(y) nie dotrą do tkanki docelowej, przeprowadzenie tego badania może nie być wskazane.

Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

▼M7

ZASADA METODY BADAWCZEJ

Zwierzęta poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej z zastosowaniem odpowiedniej drogi narażenia, a po upływie odpowiedniego czasu od podania substancji chemicznej uśmierca się je w humanitarny sposób. Przed uśmierceniem zwierzętom podaje się substancję chemiczną zawierającą środek zatrzymujący metafazę (np. kolchicynę lub colcemid). Następnie z komórek szpiku kostnego przygotowuje się preparaty chromosomowe, które się barwi, po czym komórki w metafazie bada się pod kątem wystąpienia aberracji chromosomowych.

WERYFIKACJA BIEGŁOŚCI LABORATORIUM

Badanie biegłości

Aby ustalić wystarczające doświadczenie laboratorium w zakresie omawianego testu przed zastosowaniem go w rutynowych badaniach, laboratorium powinno wykazać zdolność do odtworzenia oczekiwanych wyników na podstawie opublikowanych danych (np. (6)) w odniesieniu do częstości występowania aberracji chromosomowych z zastosowaniem co najmniej dwóch substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej (uwzględniając słabe reakcje wywołane niskimi dawkami substancji służących do kontroli dodatniej), takich jak substancje wymienione w tabeli 1, oraz z zastosowaniem kontroli ze zgodnym nośnikiem/rozpuszczalnikiem (zob. pkt 22). W tego rodzaju doświadczeniach należy stosować dawki, które prowadzą do powstania możliwych do odtworzenia i powiązanych z wielkością dawki przyrostów i które umożliwiają wykazanie czułości i zakresu oznaczania układu badawczego w odniesieniu do tkanki będącej przedmiotem zainteresowania (szpik kostny) przy wykorzystaniu metody zliczania, która ma być stosowana w laboratorium. Wymóg ten nie dotyczy laboratoriów, które dysponują odpowiednim doświadczeniem, tj. laboratoriów prowadzących bazę danych historycznych, o której mowa w pkt 10–14.

Dane historyczne dotyczące kontroli

W toku badań biegłości laboratorium powinno ustalić:

— zakres i rozkład historycznych wyników kontroli dodatniej oraz

— zakres i rozkład historycznych wyników kontroli ujemnej.

Przy pierwszym gromadzeniu danych dotyczących rozkładu historycznych wyników kontroli ujemnej wyniki jednoczesnej kontroli ujemnej powinny być zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli, o ile takie dane istnieją. W miarę dodawania kolejnych danych doświadczalnych do rozkładu danych historycznych dotyczących kontroli jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla tego rozkładu. Prowadzona przez dane laboratorium baza danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej powinna być statystycznie istotna, aby zapewnić zdolność laboratorium do oceny rozkładu własnych danych dotyczących kontroli ujemnej. Z literatury przedmiotu wynika, że baza danych powinna zawierać wyniki co najmniej 10 doświadczeń, ale najlepiej co najmniej 20 doświadczeń przeprowadzonych w porównywalnych warunkach doświadczalnych. Laboratoria powinny stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (7)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest „pod kontrolą”. Dalsze zalecenia dotyczące sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych (tj. kryteria włączania danych do zbioru danych historycznych i wykluczania danych z tego zbioru oraz kryteria dopuszczalności dla danego doświadczenia) można znaleźć w literaturze (8).

Jeżeli laboratorium nie przeprowadziło dostatecznie dużej liczby doświadczeń, aby ustalić istotny statystycznie rozkład danych z kontroli ujemnej (zob. pkt 11) w trakcie badań biegłości (opisanych w pkt 9), dopuszcza się możliwość ustalenia rozkładu w trakcie pierwszych rutynowych badań. Takie podejście powinno być zgodne z zaleceniami przedstawionymi w literaturze (8), a wyniki kontroli ujemnej uzyskane w ramach tych doświadczeń powinny pozostać zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli ujemnej.

▼M7

Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem tego, czy ich wpływ na otrzymywane dane pozostaje spójny z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wyłącznie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli, w przypadku gdy z ekspertyzy wynika, że dane odbiegają od poprzedniego rozkładu (zob. pkt 11). Podczas tworzenia nowej bazy danych utworzenie kompletnej bazy danych dotyczących kontroli ujemnej może nie być konieczne do przeprowadzenia samego badania, o ile laboratorium może wykazać, że wartości uzyskiwane przez nie w ramach jednoczesnej kontroli ujemnej pozostają zgodne z wynikami zawartymi w jego poprzedniej bazie danych albo z odpowiednimi opublikowanymi danymi.

Dane dotyczące kontroli ujemnej powinny obejmować częstość występowania strukturalnych aberracji chromosomowych (w tym przerw) u każdego zwierzęcia. Jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla rozkładu danych zawartych w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej. W przypadku gdy dane dotyczące jednoczesnej kontroli ujemnej nie mieszczą się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 %, włączenie ich do rozkładu kontroli historycznej może być dopuszczalne, pod warunkiem że dane te nie stanowią skrajnych obserwacji nietypowych oraz że istnieją dowody świadczące o tym, iż dany układ badawczy znajduje się „pod kontrolą” (zob. pkt 11), a także nie ma dowodów wskazujących na błąd techniczny lub ludzki.

OPIS METODY

Przygotowania

Wybór gatunku zwierząt

Należy prowadzić badania na zdrowych, młodych, dorosłych zwierzętach pochodzących ze szczepów na ogół wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych. Badania przeprowadza się zazwyczaj na szczurach, choć wykorzystywanie myszy również można uznać za stosowne. Dopuszcza się również możliwość wykorzystania wszelkich innych odpowiednich gatunków ssaków, o ile w sprawozdaniu zostanie przedstawione uzasadnienie naukowe.

Warunki utrzymywania i karmienia

W przypadku gryzoni temperatura w pomieszczeniu dla zwierząt powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 40 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza okresami czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne z zachowaniem cyklu 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne oraz należy zapewnić zwierzętom nieograniczony dostęp do wody do picia. Wybór paszy może zależeć od potrzeby zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej, jeżeli jest ona podawana tą drogą. Gryzonie należy trzymać w małych grupach (nie więcej niż pięć sztuk) składających się ze zwierząt tej samej płci i należących do tej samej grupy badanej, jeżeli nie przewiduje się, że mogłoby dojść do agresywnego zachowania, najlepiej w klatkach z pełną podłogą, oraz zapewnić im odpowiednie urozmaicenie warunków bytowania. Zwierzęta można utrzymywać pojedynczo tylko wtedy, gdy ma to uzasadnienie naukowe.

Przygotowanie zwierząt

Zazwyczaj wykorzystuje się zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta (w przypadku gryzoni najlepiej w wieku 6–10 tygodni na początku poddawania działaniu substancji chemicznej, chociaż dopuszcza się również używanie nieco starszych zwierząt), które losowo przydziela się do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu substancji chemicznej. Zwierzęta zostają indywidualnie oznakowane przy użyciu humanitarnej, mało inwazyjnej metody (np. poprzez obrączkowanie, kolczykowanie, wszczepianie mikroukładów i identyfikację biometryczną, ale nie przycinanie uszu lub palców) i aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez co najmniej pięć dni. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Należy unikać zanieczyszczenia krzyżowego kontrolą dodatnią i badaną substancją chemiczną. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać ± 20 % średniej masy dla każdej płci.

Przygotowanie dawek

Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuszczać lub przygotowywać w postaci zawiesiny w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach lub dodawać do paszy lub wody do picia przed podaniem dawki zwierzętom. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym mogą być dawkowane

▼M7

bezpośrednio lub można je rozcieńczać przed dawkowaniem. W przypadku narażenia inhalacyjnego badane substancje chemiczne można podawać w postaci gazu, pary lub stałych/ciekłych aerozoli, w zależności od ich właściwości fizykochemicznych. Należy stosować świeże preparaty badanej substancji chemicznej, chyba że z danych dotyczących stabilności wynika, iż przechowywanie tych preparatów jest dopuszczalne, i chyba że w danych tych określono warunki prawidłowego przechowywania takich preparatów.

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem

Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien wywoływać efektów toksycznych przy stosowanych poziomach dawek oraz nie powinno istnieć ryzyko, że wejdzie on w reakcję chemiczną z badanymi substancjami chemicznymi. Jeśli wykorzystywane są inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki, ich włączenie do doświadczenia powinno być poparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć zastosowanie wodnego rozpuszczalnika/nośnika. Wśród przykładów powszechnie wykorzystywanych zgodnych rozpuszczalników/nośników można wymienić wodę, sól fizjologiczną, roztwór metylocelulozy, roztwór soli sodowej karboksymetylocelulozy, oliwę z oliwek i olej kukurydziany. W przypadku braku historycznych lub opublikowanych danych dotyczących kontroli wskazujących, że wybrany nietypowy rozpuszczalnik/nośnik nie indukuje strukturalnych aberracji chromosomowych ani nie powoduje żadnego innego szkodliwego efektu, należy wykonać badanie wstępne w celu ustalenia dopuszczalności stosowania kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem.

Kontrole

Kontrole dodatnie

W każdym badaniu należy co do zasady uwzględnić grupę zwierząt otrzymującą substancję chemiczną służącą do kontroli dodatniej. Od tego obowiązku można odstąpić, jeżeli laboratorium badawcze wykaże biegłość w przeprowadzaniu takiego badania i ustanowi zakres historycznych wyników kontroli dodatniej. W przypadku nieuwzględnienia jednoczesnej kontroli dodatniej do każdego doświadczenia należy włączyć kontrolę na potrzeby oceny ilościowej (utrwalone i niebarwione preparaty). Tego rodzaju kontrole można przeprowadzić, włączając do oceny ilościowej wyników badania odpowiednie próbki referencyjne, które zostały pozyskane w trakcie odrębnego przeprowadzanego okresowo (np. co 6–18 miesięcy) doświadczenia z wykorzystaniem kontroli dodatniej i które są przechowywane w laboratorium przeprowadzającym test; na przykład w trakcie badania biegłości i – w stosownych przypadkach – w regularnych odstępach czasu w późniejszym okresie.

Substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej powinny w przewidywalny sposób generować zauważalny wzrost częstości występowania komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi w porównaniu z częstością samorzutną. Dawki stosowane do celów kontroli dodatniej należy dobierać w taki sposób, aby efekty były jasne, lecz aby osoba zliczająca nie była w stanie natychmiast zidentyfikować zakodowanych próbek. Dopuszcza się, aby substancja chemiczna służąca do kontroli dodatniej była podawana inną drogą niż badana substancja chemiczna i zgodnie z innym harmonogramem podawania substancji chemicznej, a także aby próbki były pobierane wyłącznie w określonym czasie. Ponadto w stosownych przypadkach można rozważyć możliwość zastosowania substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej powiązanych z określoną klasą chemiczną. W tabeli 1 przedstawiono przykładowe substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej.

Tabela 1

Przykładowe substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej

Substancja chemiczna	Numer CAS
Metanosulfonian etylu	62-50-0
Metanosulfonian metylu	66-27-3
Etylonitrozomocznik	759-73-9
Mitomycyna C	50-07-7
Cyklofosfamid (monohydrat)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietylenomelamina	51-18-3

▼M7

Kontrole ujemne

Od zwierząt z grupy kontrolnej ujemnej należy pobierać próbki w każdym okresie pobierania próbek i należy postępować z nimi w taki sam sposób, jak ze zwierzętami należącymi do grupy badanej, z tym że nie poddaje się ich działaniu badanej substancji chemicznej. Jeżeli do podania badanej substancji chemicznej wykorzystuje się rozpuszczalnik/nośnik, zwierzętom należącym do grupy kontrolnej również należy podać ten rozpuszczalnik/nośnik. Jeżeli jednak dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej gromadzone przez laboratorium badawcze przy każdorazowym pobieraniu próbek będą wskazywały na stały poziom zmienności pomiędzy zwierzętami i stałą częstość występowania komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi, konieczne może być tylko jedno pobranie próbek na potrzeby kontroli ujemnej. Jeżeli w ramach kontroli ujemnej przeprowadza się tylko jedno pobieranie próbek, próbki należy pobrać w pierwszym okresie pobierania próbek w ramach badania.

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

Na ogół reakcja mikrojądrowa jest podobna u samców i samic (9) i oczekuje się, że podobnie będzie w przypadku strukturalnych aberracji chromosomowych; dlatego też większość badań można przeprowadzić na zwierzętach dowolnej płci. Dane wskazujące na występowanie istotnych różnic między samcami i samicami (np. różnice w toksyczności ogólnoustrojowej, metabolizmie, biodostępności, toksyczności w szpiku kostnym itd., w tym np. w badaniu ustalającym zakres dawkowania) stanowią przesłankę przemawiającą za przeprowadzaniem badań na zwierzętach obu płci. W takim przypadku właściwe może być przeprowadzenie badania na zwierzętach obu płci, np. w ramach badania toksyczności dawki powtórzonej. Zastosowanie planu czynnikowego może być właściwe, jeżeli do badania używa się zwierząt obu płci. Szczegółowe informacje dotyczące sposobu analizy danych z wykorzystaniem tego planu można znaleźć w dodatku 2.

Na początku badania należy ustalić liczebność grup w celu zapewnienia w każdej grupie co najmniej 5 nadających się do poddania analizie zwierząt jednej płci lub każdej płci, jeżeli wykorzystuje się zwierzęta obu płci. Jeżeli narażenie człowieka na działanie substancji chemicznych może mieć charakter uzależniony od płci, jak to na przykład ma miejsce w przypadku niektórych produktów leczniczych, badanie należy przeprowadzić na zwierzętach odpowiedniej płci. Wskazówka odnośnie do maksymalnych typowych wymagań w zakresie liczby zwierząt – w przypadku badania szpiku kostnego, w ramach którego dwukrotnie pobiera się próbki, z trzema grupami otrzymującymi dawki i jednoczesną kontrolą ujemną i dodatnią (każda grupa złożona z pięciu zwierząt jednej płci) wymagane byłoby użycie 45 zwierząt.

Poziomy dawek

W przypadku przeprowadzenia wstępnego badania ustalającego zakres dawkowania ze względu na brak dostępnych odpowiednich danych umożliwiających dobranie dawki, badanie takie należy wykonać w tym samym laboratorium z wykorzystaniem tego samego gatunku, szczepu, płci i schematu podawania substancji chemicznej, jakie mają być stosowane w badaniu głównym (10). Celem badania powinno być określenie maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) zdefiniowanej jako najwyższa dawka tolerowana bez wywoływania objawów toksyczności ograniczającej badanie w stosunku do czasu trwania badania (na przykład dawka wywołująca spadek masy ciała lub cytotoksyczność układu krwiotwórczego, ale niepowodująca śmierci lub objawów bólu, cierpienia lub stresu, które wiązałyby się z koniecznością uśmiercenia zwierzęcia w humanitarny sposób (11)).

Najwyższą dawkę można również zdefiniować jako dawkę, która wywołuje pewne oznaki toksyczności w szpiku kostnym.

Substancje chemiczne wykazujące intensywne parametry toksykokinetyczne lub wywołujące procesy detoksykacji, które mogą prowadzić do zmniejszenia narażenia po długim okresie podawania substancji chemicznej, mogą stanowić wyjątki w odniesieniu do kryteriów ustalania dawki i powinny być oceniane na zasadzie jednostkowych przypadków.

Aby uzyskać informacje na temat zależności dawka-odpowiedź, w kompletnym badaniu należy uwzględnić grupę kontrolną ujemną oraz co najmniej trzy poziomy dawek, przy czym każda kolejna dawka jest większa od poprzedniej na ogół dwukrotnie, ale nie więcej niż czterokrotnie. Jeżeli wyniki badania ustalającego zakres dawkowania lub istniejące dane będą wskazywały, że badana substancja chemiczna nie wywołuje toksyczności, najwyższa dawka w przypadku podania jednorazowego powinna wynosić 2 000 mg/kg masy ciała. Jeżeli jednak

▼M7

badana substancja chemiczna będzie miała działanie toksyczne, maksymalną tolerowaną dawkę należy ustalić na poziomie odpowiadającym najwyższej podanej dawce, przy czym najlepiej byłoby, gdyby zastosowane poziomy dawek obejmowały zakres od dawki maksymalnej do dawki wywołującej toksyczność w niewielkim stopniu lub dawki niewywołującej toksyczności. W przypadku zaobserwowania toksyczności w tkance docelowej (szpiku kostnym) przy wszystkich badanych poziomach dawek zaleca się dalsze badania z wykorzystaniem dawek nietoksycznych. W przypadku badań przeprowadzanych w celu uzyskania bardziej szczegółowych ilościowych informacji na temat zależności dawka-odpowiedź konieczne może okazać się utworzenie dodatkowych grup otrzymujących dawki. Wspomniane wartości graniczne mogą różnić się w przypadku niektórych rodzajów badanych substancji chemicznych (np. produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi), które podlegają szczególnym wymogom.

Badanie graniczne

Jeżeli wyniki badania ustalającego zakres dawkowania lub dostępne dane na temat powiązanych szczepów zwierząt będą wskazywały, że poddanie zwierząt działaniu substancji chemicznej w stężeniu odpowiadającym co najmniej dawce granicznej (o której mowa poniżej) nie wywołuje żadnych możliwych do zaobserwowania efektów toksycznych (w tym spadku tempa dzielenia się komórek szpiku kostnego lub innych oznak świadczących o cytotoksyczności tkanki docelowej), i jeżeli wyniki badań genotoksyczności *in vitro* lub dane dotyczące strukturalnie powiązanych substancji chemicznych nie będą wskazywały na możliwość wystąpienia genotoksyczności, przeprowadzenie pełnego badania z trzema poziomami dawek może nie być konieczne, o ile wykazano, że badane substancje chemiczne docierają do tkanki docelowej (szpiku kostnego). W takich przypadkach pojedynczy poziom dawki, odpowiadający dawce granicznej, może być wystarczający. Jeżeli okres podawania przekracza 14 dni, dawka graniczna wynosi 1 000 mg/kg masy ciała na dobę. W przypadku okresów podawania wynoszących 14 dni lub mniej dawka graniczna wynosi 2 000 mg/kg masy ciała na dobę.

Podawanie dawek

Planując badanie, należy wziąć pod uwagę przewidywaną drogę narażenia ludzi. W związku z tym można wybrać jako uzasadnione takie drogi podawania, jak: w pokarmie, z wodą do picia, miejscowe, podskórne, dożylne, ustne (przez sondę), przez wdychanie, dotchawicze lub przez implantację. W każdym razie drogę narażenia należy dobrać w taki sposób, aby zapewnić odpowiednie narażenie tkanek docelowych. Nie zaleca się na ogół dokonywania wstrzyknięć dootrzewnowych, ponieważ nie jest to typowa droga narażenia ludzi – taką drogę należy stosować wyłącznie w przypadku wystąpienia konkretnego uzasadnienia naukowego. Jeżeli badaną substancję chemiczną dodaje się do paszy lub wody do picia, w szczególności w przypadku pojedynczej dawki substancji, należy upewnić się, że okres między spożyciem paszy i wody a pobraniem próbki jest wystarczający do tego, aby zapewnić możliwość wykrycia skutków podania substancji (zob. pkt 33–34). Maksymalna objętość płynu, jaką można podać przez sondę lub wstrzyknąć jednorazowo, zależy od wielkości zwierzęcia doświadczalnego. Objętość ta nie powinna co do zasady przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można zastosować maksymalnie 2 ml/100 g masy ciała. Wykorzystanie objętości wyższych niż podane musi być uzasadnione. Należy ograniczyć zmienność objętości stosowanej w badaniu, dostosowując stężenie w taki sposób, by zapewnić podawanie substancji chemicznej w takiej samej objętości w stosunku do masy ciała przy wszystkich poziomach dawek – nie dotyczy to jednak badanych substancji chemicznych o podrażniającym lub żrącym działaniu, które w normalnych warunkach wywołują poważniejsze skutki w przypadku ich podania w wyższych stężeniach.

Harmonogram podawania substancji chemicznej

Badane substancje chemiczne podaje się zwykle jako pojedynczą dawkę, ale można je również podawać jako dawkę dzieloną (tj. co najmniej dwa podania substancji tego samego dnia w odstępie czasu nie większym niż 2–3 godziny), aby łatwiej było podawać substancję w dużej objętości. W takim przypadku lub przy podawaniu badanej substancji chemicznej drogą wziewną okres pobierania próbek należy zaplanować w oparciu o czas podania ostatniej dawki lub czas ustania narażenia na działanie substancji.

Obecnie dostępnych jest niewiele danych na temat odpowiedniości metody powtarzanego dawkowania w kontekście niniejszego testu. W przypadku jednak, gdy połączenie niniejszego testu z badaniem toksyczności dawki powtórzonej byłoby pożądane, należy dołożyć starań, aby uniknąć utraty komórek mitotycznych z aberracjami chromosomowymi, co może nastąpić w przypadku podania

▼M7

dawek toksycznych. Tego rodzaju połączenie jest dopuszczalne, w przypadku gdy najwyższa dawka jest większa niż dawka graniczna lub równa dawce granicznej (zob. pkt 29), a dawkę graniczną podaje się grupie otrzymującej dawkę przez cały okres podawania substancji chemicznej. Test mikrojądrowy (metoda badawcza B.12) należy postrzegać jako preferowaną metodę badania *in vivo* pod kątem aberracji chromosomowych, w przypadku gdy pożądane jest połączenie tej metody z innymi metodami badawczymi.

Próbki szpiku kostnego należy pobrać dwukrotnie w różnym czasie po poddaniu pojedynczych dawek substancji. W przypadku gryzoni czas trwania pierwszego okresu pobierania próbek powinien odpowiadać 1,5-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego (cykl komórkowy trwa zazwyczaj od 12 do 18 godzin od zakończenia okresu poddawania działaniu substancji chemicznej). Ponieważ czas wymagany na wchłonięcie i metabolizm badanych substancji chemicznych oraz jego skutki dla kinetyki cyklu komórkowego mogą wywierać wpływ na optymalny czas na wykrycie aberracji chromosomowej, zaleca się pobranie próbek w późniejszym terminie, tj. po upływie 24 godzin od pierwszego pobrania próbek. Przy pierwszym pobraniu próbek wszystkie grupy otrzymujące dawki powinny zostać poddane działaniu substancji chemicznej, po czym należy pobrać próbki do analizy; w kolejnych okresach pobierania próbek należy jednak podawać wyłącznie najwyższą dawkę. Jeżeli z uzasadnionych naukowo względów dawki podaje się częściej niż raz dziennie, z reguły powinno się przeprowadzić jedno pobranie próbek po upływie około 1,5-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego od ostatniego poddania działaniu substancji chemicznej.

Po poddaniu działaniu substancji chemicznej i przed pobraniem próbki zwierzętom wstrzykuje się dootrzewnowo odpowiednią dawkę środka zatrzymującego metafazę (np. colcemidu lub kolchicyny), a próbki pobiera się po upływie odpowiedniego czasu od wstrzyknięcia tego środka. W przypadku myszy przed pobraniem próbek musi upłynąć 3–5 godzin, a w przypadku szczurów – 2–5 godzin. Komórki pobiera się ze szpiku kostnego, powiększa się je, utrwala i barwi, po czym bada się je pod kątem wystąpienia aberracji chromosomowych (12).

Obserwacje

Ogólne obserwacje kliniczne zwierząt doświadczalnych wraz z rejestrowaniem objawów klinicznych powinny odbywać się co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze oraz z uwzględnieniem szczytowego okresu przewidywanych skutków po dawkowaniu. Co najmniej dwa razy dziennie w trakcie okresu dawkowania wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane pod kątem zachorowalności i upadkowości. Wszystkie zwierzęta powinny być ważone na początku badania, co najmniej raz w tygodniu w trakcie badań dawki powtórzonej oraz po uśmierceniu. W przypadku badań trwających co najmniej tydzień co najmniej raz w tygodniu należy dokonywać pomiaru ilości spożytego pokarmu. Jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie do picia, należy mierzyć spożycie wody przy każdej zmianie wody i co najmniej raz w tygodniu. Zwierzęta, u których stwierdzono oznaki podwyższonej toksyczności nieprowadzące do śmierci, należy uśmiercić w humanitarny sposób przed zakończeniem okresu badania (11).

Narażenie tkanki docelowej

W odpowiednim momencie badania należy pobrać próbkę krwi, aby zbadać poziomy osocza po zastosowaniu badanych substancji chemicznych celem wykazania, że doszło do narażenia szpiku kostnego, jeżeli będzie to zasadne i jeżeli nie ma żadnych innych danych dotyczących narażenia (zob. pkt 44).

Szpik kostny i preparaty chromosomowe

Natychmiast po uśmierceniu zwierząt w humanitarny sposób z ich kości udowych lub piszczelowych pobiera się komórki szpiku kostnego, które są następnie poddawane działaniu roztworu hipotonicznego i utrwalane. Komórki w metafazie rozprowadza się następnie na szkiełkach mikroskopowych i barwi się je, stosując standardowe metody (zob. (3) (12)).

▼M7

Analiza

Wszystkie preparaty, w tym te stanowiące kontrolę dodatnią i ujemną, należy indywidualnie zakodować i zrandomizować, tak aby osoba zliczająca nie znała warunków podawania substancji chemicznej.

Indeks mitotyczny należy oznaczyć jako miarę cytotoksyczności w przynajmniej 1 000 komórek na zwierzę w odniesieniu do wszystkich zwierząt poddanych działaniu substancji chemicznej (uwzględniając kontrole dodatnie), zwierząt niepoddanych działaniu substancji chemicznej lub zwierząt z grupy kontroli ujemnej z nośnikiem/rozpuszczalnikiem.

W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy zbadać co najmniej 200 metafaz pod kątem występowania strukturalnych aberracji chromosomowych, z uwzględnieniem lub z pominięciem przerw (6). Jeżeli informacje przechowywane w bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej wskazują, że średnia podstawowa częstość występowania strukturalnych aberracji chromosomowych w danym laboratorium badawczym jest niższa niż 1 %, należy rozważyć możliwość oceny ilościowej dodatkowych komórek. Aberracje typu chromatydowego i chromosomowego należy odnotowywać oddzielnie i klasyfikować według podtypów (złamania, wymiany). Procedury stosowane w laboratorium powinny zapewniać przeprowadzanie analizy aberracji chromosomowych przez odpowiednio przeszkolonych pracowników odpowiadających za zliczanie oraz – w stosownych przypadkach – poddanie wyników tej analizy wzajemnej ocenie. Z uwagi na fakt, że w trakcie przygotowywania preparatów często dochodzi do złamań w części komórek w metafazie, co prowadzi do utraty chromosomów, zliczane komórki powinny zawierać liczbę centromerów wynoszącą co najmniej $2n \pm 2$, gdzie n stanowi haploidalną liczbę chromosomów dla danego gatunku.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

Dane dotyczące poszczególnych zwierząt należy przedstawić w postaci tabeli. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy ocenić indeks mitotyczny, liczbę zliczonych komórek w metafazie, liczbę aberracji wykrytych w poszczególnych komórkach metafazy oraz odsetek komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi. Należy wymienić rodzaje strukturalnych aberracji chromosomowych, podając informacje o ich liczbie i częstości występowania u grup poddanych działaniu substancji chemicznej i u grup kontrolnych. Przerwy, jak również komórki poliploidalne i komórki z endoreduplikowanymi chromosomami, odnotowuje się odrębnie. Częstość występowania przerw zgłasza się, lecz zazwyczaj nie bierze się jej pod uwagę do celów analizy ogólnej częstości występowania strukturalnych aberracji chromosomowych. W przypadku braku dowodów na różnicę w reakcji pomiędzy płciami dane można połączyć na potrzeby analizy statystycznej. Należy również zgłosić dane dotyczące toksyczności u zwierząt i objawów klinicznych.

Kryteria dopuszczalności

Dopuszczalność badania ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

a) uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących jednoczesnej kontroli ujemnej do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli (zob. pkt 11–14);

b) jednoczesne kontrole dodatnie lub kontrole na potrzeby oceny ilościowej powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 20–21);

c) objęto analizą odpowiednią liczbę dawek i komórek;

d) kryteria wyboru najwyższej dawki są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 25–28.

Ocena i interpretacja wyników

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli:

▼M7

a) co najmniej jedna z grup badanych wykazuje statystycznie istotny wzrost częstości występowania komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi (z wyjątkiem przerw) w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,

b) ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany z dawką w co najmniej jednym okresie pobierania próbek, oraz

c) którykolwiek z otrzymanych wyników znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona;

Jeżeli w danym okresie pobierania próbek bada się wyłącznie najwyższą dawkę, badaną substancję chemiczną uznaje się za dającą wynik wyraźnie dodatni, jeżeli odnotowano statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną, a wyniki znajdują się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona). Zalecenia dotyczące odpowiednich metod statystycznych można znaleźć w literaturze (13). Przy przeprowadzaniu analizy dawka-odpowiedź należy zbadać co najmniej trzy grupy otrzymujące dawkę, które poddano działaniu substancji chemicznej. W badaniach statystycznych należy przyjąć, że jednostką doświadczalną jest zwierzę. Wyniki dodatnie uzyskane w teście aberracji chromosomowej świadczą o tym, że badana substancja chemiczna indukuje strukturalne aberracje chromosomowe w szpiku kostnym badanego gatunku.

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych:

a) w żadnej grupie badanej nie odnotowano statystycznie istotnego wzrostu częstości występowania komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi (z pominięciem przerw) w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,

b) ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany z dawką w żadnym okresie pobierania próbek,

c) wszystkie wyniki mieszczą się w rozkładzie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona), oraz

d) doszło do narażenia szpiku kostnego na działanie badanej substancji chemicznej lub badanych substancji chemicznych.

Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można znaleźć w literaturze (13). Za dowody świadczące o narażeniu szpiku kostnego na działanie badanej substancji chemicznej można uznać spadek wartości indeksu mitotycznego lub wyniki pomiaru stężenia badanej substancji chemicznej w osoczu lub we krwi. Jeżeli substancję chemiczną podano drogą dożylną, przedstawienie dowodów narażenia na działanie substancji chemicznej nie jest konieczne. Ewentualnie narażenie szpiku kostnego na działanie substancji chemicznej można wykazać w oparciu o dane dotyczące wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania (ADME) pozyskane w ramach niezależnego badania przeprowadzonego z zastosowaniem tej samej drogi i na tych samych gatunkach. Wyniki ujemne świadczą o tym, że w warunkach badania badana substancja chemiczna nie indukuje strukturalnych aberracji chromosomowych w szpiku kostnym badanego gatunku.

Weryfikacja wyraźnie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

Jeżeli reakcja nie jest ani wyraźnie ujemna, ani wyraźnie dodatnia, oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku (np. niewielki lub graniczny wzrost), dane powinny zostać ocenione na podstawie opinii eksperta lub wyników dalszych badań przeprowadzonych w ramach już zakończonych doświadczeń. W niektórych przypadkach warto rozważyć możliwość zbadania większej liczby komórek lub powtórzenia doświadczenia w zmienionych warunkach doświadczalnych.

▼M7

W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskane dane uniemożliwią wyciągnięcie wniosku, iż badana substancja chemiczna daje wyniki dodatnie albo ujemne i w takiej sytuacji badanie zostanie uznane za niejednoznaczne.

Informacje na temat częstości występowania metafaz, w których odnotowano wystąpienie poliploidalności i endoreduplikacji, w stosunku do łącznej liczby metafaz należy odnotować osobno. Wzrost liczby komórek poliploidalnych/endoreduplikowanych może świadczyć o tym, że badana substancja chemiczna może potencjalnie hamować procesy mitotyczne lub przebieg cyklu komórkowego (zob. pkt 3).

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Podsumowanie

Badana substancja chemiczna:

— źródło, numer partii, data graniczna do użytku, jeżeli jest dostępna;

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości za pomocą nazwy systematycznej (zob. powyżej), określenia ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej:

— uzasadnienie wyboru nośnika;

— rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli są znane;

— przygotowanie postaci użytkowych przeznaczonych do spożycia w paszy i z wodą do picia lub w formie wziewnej;

— oznaczenie analityczne postaci użytkowych (np. stabilność, homogeniczność, stężenia nominalne), jeżeli jest przeprowadzane.

Zwierzęta doświadczalne:

— gatunek/szczep wykorzystywany w badaniu wraz z uzasadnieniem jego wyboru;

— liczba, wiek i płeć zwierząt;

— źródło, warunki utrzymywania, pasza itp.;

— metoda indywidualnego znakowania zwierząt;

— w przypadku badań krótkoterminowych: masa ciała poszczególnych zwierząt na początku i na końcu badania; w przypadku badań trwających dłużej niż jeden tydzień: masa ciała poszczególnych zwierząt w trakcie badania oraz informacje o spożyciu pokarmu. W odniesieniu do każdej grupy należy uwzględnić informacje o zakresie masy ciała oraz o średniej i odchyleniu standardowym.

▼M7

Warunki badania:

— kontrole dodatnie i ujemne (z nośnikiem/rozpuszczalnikiem);

— dane zgromadzone w ramach badania ustalającego zakres dawkowania, jeżeli zostało przeprowadzone;

— uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania;

— szczegółowe informacje dotyczące przygotowania badanej substancji chemicznej;

— szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej;

— uzasadnienie drogi podawania i długości okresu podawania;

— metody stosowane w celu sprawdzenia, czy badane substancje chemiczne dostały się do krwiobiegu lub dotarły do szpiku kostnego;

— dawka faktyczna (mg/kg masy ciała na dobę) obliczona w oparciu o stężenie badanej substancji chemicznej w paszy / wodzie do picia (ppm) i spożycie, w stosownych przypadkach;

— szczegółowe informacje dotyczące jakości pokarmu i wody;

— metoda uśmiercenia;

— metoda analgezji (jeżeli jest stosowana);

— szczegółowy opis harmonogramów podawania substancji chemicznej i pobierania próbek oraz ich uzasadnienie;

— metody przygotowywania preparatów;

— metody pomiaru toksyczności;

— nazwa substancji chemicznej zatrzymującej metafazę, jej stężenie, dawkowanie i czas podawania przed pobraniem próbek;

— procedury izolowania i konserwacji próbek;

— kryteria oceny aberracji;

— liczba zbadanych komórek w metafazie na zwierzę i liczba komórek zbadanych pod kątem oznaczenia indeksu mitotycznego;

— kryteria dopuszczalności badania;

— kryteria uznawania wyników badań za dodatnie, ujemne lub niejednoznaczne.

Wyniki:

— stan zwierząt przed badaniem i podczas całego okresu badania, w tym oznaki toksyczności;

— indeks mitotyczny podawany osobno dla każdego zwierzęcia;

— rodzaj i liczba aberracji oraz komórek, w których stwierdzono wystąpienie aberracji, podawane osobno dla każdego zwierzęcia;

— łączna liczba aberracji na grupę wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi;

— liczba komórek z aberracjami na grupę wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi;

— zmiany ploidalności, jeżeli zostały zaobserwowane, w tym informacje na temat częstości występowania komórek poliploidalnych lub endoreduplikowanych;

▼M7

— w stosownych przypadkach zależność dawka-odpowiedź;

— zastosowane analizy i metody statystyczne;

— dane potwierdzające, że doszło do narażenia szpiku kostnego na działanie substancji chemicznej;

— dane dotyczące jednoczesnej kontroli ujemnej i jednoczesnej kontroli dodatniej wraz z zakresami, średnimi oraz odchyleniami standardowymi;

— dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej i dodatniej wraz z zakresami, średnimi i odchyleniami standardowymi oraz granice kontrolne wyznaczające przedział 95 % dla rozkładu, uwzględniając czas objęty obserwacją oraz liczbę obserwacji;

— spełnienie kryteriów pozwalających uznać reakcję za dodatnią lub ujemną.

Omówienie wyników.

Wniosek.

Bibliografia.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015, publikacje OECD na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny, nr 234, OECD, Paryż.

(2) Adler, I.D. (1984), „Cytogenetic Tests in Mammals”, w: Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (red.), IRL Press, Waszyngton, D.C., s. 275–306.

(3) Preston, R.J. *et al.* (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, t. 189/2, s. 157–165.

(4) Richold, M. *et al.* (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays”, w: Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Sprawozdanie. Część I zmieniona, Kirkland, D.J. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 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, t. 312/3, s. 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, t. 417/1, s. 19–30.

(7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, wyd. II, John Wiley and Sons, Nowy Jork.

(8) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, t. 723/2, s. 87–90.

(9) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, t. 312/3, s. 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, t. 7/5, s. 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”, publikacje OECD na temat środowiska zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny, nr 19, OECD Publishing, Paryż.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, t. 1044, s. 147–163.

(13) Lovell, D.P. *et al.* (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays”, w: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 184–232.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICJE

Aneuploidia: wszelkie odchylenia od zwykłej diploidalnej (lub haploidalnej) liczby chromosomów w pojedynczym chromosomie lub w większej ich liczbie, ale nie w całym zestawie czy całych zestawach chromosomów (por. poliploidalność).

Centromer: region(y) chromosomu, w którym(-ch) mikrotubule wrzeciona podziałowego są asocjowane w trakcie podziału komórki, co umożliwia przemieszczenie się chromosomów potomnych do biegunów komórek potomnych.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Aberracja typu chromatydowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu wyrażone jako złamanie pojedynczych chromatyd lub złamanie i ponowne połączenie się chromatyd.

Aberracja typu chromosomowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu wyrażone jako złamanie chromatyd lub złamanie i ponowne połączenie się obu chromatyd w tym samym miejscu.

Endoreduplikacja: proces, w którym po fazie S replikacji DNA jądro komórkowe nie wchodzi w fazę mitozy, lecz rozpoczyna się kolejna faza S. Wynikiem są chromosomy o 4, 8, 16, ... chromatydach.

Przerwa: achromatyczne uszkodzenie mniejsze niż szerokość jednej chromatydy prowadzące od minimalnego wypaczenia chromatyd.

Indeks mitotyczny: stosunek liczby komórek w fazie mitozy do całkowitej liczby komórek w populacji będący miarą statusu proliferacji danej populacji komórek.

Aberracja liczby: zmiana liczby chromosomów względem standardowej liczby chromosomów typowej dla wykorzystywanych zwierząt (aneuploidia).

Poliploidalność: aberracja liczby, która skutkuje zmianą liczby chromosomów w całym zestawie chromosomów, w odróżnieniu od zmiany liczby chromosomów w części zestawu chromosomów (por. aneuploidia).

Strukturalna aberracja chromosomowa: zmiana w strukturze chromosomu wykrywalna przez badanie mikroskopowe etapu metafazy w cyklu podziału komórki, zaobserwowana jako delecje, fragmenty, zmiany zachodzące między chromosomami lub w obrębie chromosomu.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M7

Dodatek 2

PLAN CZYNNIKOWY MAJĄCY NA CELU USTALENIE RÓŻNIC PŁCIOWYCH W BADANIU ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH *IN VIVO*

Plan czynnikowy i jego analiza

W ramach takiego planu poddaje się badaniu co najmniej 5 samców i 5 samic przy każdym poziomie stężenia, co oznacza wykorzystanie co najmniej 40 zwierząt (20 samców i 20 samic oraz odpowiednie kontrole dodatnie).

Plan ten, będący jednym z prostszych planów czynnikowych, jest równoważny dwukierunkowej analizie wariancji, w której płeć i poziom stężenia stanowią efekty główne. Dane te można analizować, stosując wiele standardowych pakietów oprogramowania statystycznego, takich jak SPSS, SAS, STATA i Genstat, a także wykorzystując R.

W ramach analizy dokonuje się podziału zmienności w zbiorze danych na zmienność pomiędzy płciami, zmienność pomiędzy stężeniami oraz na zmienność zależną od interakcji pomiędzy płciami i stężeniami. Każdy z członów porównuje się z szacunkową zmiennością pomiędzy zwierzętami z kontrpróby w ramach grup zwierząt tej samej płci, którym podaje się substancję chemiczną w takim samym stężeniu. Szczegółowe informacje na temat metodyki przeprowadzania tego doświadczenia można znaleźć w wielu standardowych podręcznikach statystycznych (zob. bibliografia) oraz w narzędziach pomocowych dostarczanych razem z pakietami oprogramowania statystycznego.

Analizę rozpoczyna się od sprawdzenia członu interakcji pomiędzy płcią a stężeniem w tabeli ANOVA ([1]). W przypadku braku członu istotnej interakcji połączone wartości dla poszczególnych płci lub dla poszczególnych poziomów stężeń mogą posłużyć jako ważne testy statystyczne pomiędzy poziomami na podstawie członu zmienności wewnątrzgrupowej w tabeli ANOVA.

Kolejnym etapem analizy jest podział szacunku zmienności pomiędzy stężeniami na kontrasty do celów przeprowadzenia testu reakcji pod kątem kontrastów liniowych i kwadratowych przy poszczególnych poziomach stężeń. W przypadku wystąpienia istotnej interakcji pomiędzy płcią a stężeniem człon ten można również podzielić na kontrasty interakcji pomiędzy efektem liniowym a płcią oraz pomiędzy efektem kwadratowym a płcią. Człony te umożliwiają zbadanie, czy zależność stężenie-odpowiedź przebiega równolegle dla obydwu płci, czy też otrzymuje się różne odpowiedzi dla obu płci.

Szacunek zmienności wewnątrzgrupowej można wykorzystać do przeprowadzenia testów parami w odniesieniu do różnicy między średnimi. Tego rodzaju porównania można przeprowadzać pomiędzy średnimi dla obydwu płci oraz pomiędzy średnimi dla poszczególnych poziomów stężeń, np. w celu porównania z poziomami odnotowanymi w kontrolach ujemnych. W przypadkach, w których występuje istotna interakcja, można dokonać porównań pomiędzy średnimi dla poszczególnych stężeń w ramach danej płci lub pomiędzy średnimi dla poszczególnych płci w ramach danego stężenia.

Bibliografia

Istnieje wiele podręczników statystycznych poświęconych teorii, planowaniu, metodyce, analizie i interpretacji planów czynnikowych – począwszy od najprostszych analiz dwuczynnikowych po bardziej złożone formy wykorzystywane w metodyce planowania doświadczeń. Poniższa lista nie jest wyczerpująca. Niektóre publikacje zawierają praktyczne przykłady porównywalnych planów, niekiedy razem z kodem niezbędnym do przeprowadzenia analiz przy wykorzystaniu różnych pakietów oprogramowania.

([1]) Statystycy stosujący podejście modelowe, np. ogólne modele liniowe, mogą przeprowadzić analizę w inny, choć porównywalny, sposób, ale niekoniecznie muszą korzystać z tradycyjnej tabeli ANOVA, która wywodzi się z algorytmicznych podejść do obliczania danych statystycznych opracowanych przed pojawieniem się komputerów.

▼M7

Box, G.E.P, Hunter, W.G. i Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. Nowy Jork: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. i Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. i 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 i Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.”;

▼M7

B.12. **TEST MIKROJĄDROWY NA ERYTROCYTACH SSAKÓW**

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 474 (2016). Stanowi ona część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. Opracowany został dokument OECD, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd ostatnich zmian, jakie wprowadzono do wytycznych dotyczących badań (1).

Test mikrojądrowy na komórkach ssaków *in vivo* ma szczególne znaczenie dla oceny genotoksyczności, ponieważ czynniki związane z metabolizmem, farmakokinetyką oraz procesami naprawy DNA *in vivo* – choć mogą różnić się w zależności od gatunku – są aktywne i wywierają wpływ na reakcje. Przeprowadzenie testu *in vivo* jest również przydatne do celów dalszego badania genotoksyczności stwierdzonej w układzie *in vitro*.

Test mikrojądrowy na erytrocytach ssaków *in vivo* przeprowadza się w celu wykrycia indukowanych działaniem badanej substancji chemicznej uszkodzeń chromosomów lub aparatu mitotycznego erytroblastów. W teście ocenia się proces formowania mikrojądra w erytrocytach pobranych ze szpiku kostnego albo z komórek krwi obwodowej zwierząt, zazwyczaj gryzoni.

Celem testu mikrojądrowego jest zidentyfikowanie substancji chemicznych wywołujących uszkodzenia cytogenetyczne, które prowadzą do powstania mikrojąder zawierających opóźnione fragmenty chromosomów opóźnionych albo całe chromosomy.

Jeżeli erytroblast szpiku kostnego przekształci się w niedojrzały erytrocyt (określany również niekiedy jako erytrocyt polichromatyczny lub retikulocyt), główne jądro komórkowe zostaje usunięte; w takim przypadku jakiekolwiek mikrojądro, które powstało w trakcie tego procesu, może pozostać w cytoplazmie. W takich komórkach łatwiej jest wizualizować lub wykrywać mikrojądra, ponieważ nie występuje w nich główne jądro komórkowe. Wzrost częstości występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra u zwierząt poddanych działaniu substancji chemicznej świadczy o tym, że substancja ta przyczyniła się do powstania strukturalnych aberracji chromosomowych lub aberracji liczby.

Nowo powstałe erytrocyty zawierające mikrojądra wykrywa się i ustala się ich liczbę poprzez barwienie, a następnie zlicza się je metodą wzrokową przy wykorzystaniu mikroskopu albo przeprowadza się zautomatyzowaną analizę. Zliczanie dostatecznej liczby niedojrzałych erytrocytów w krwi obwodowej lub szpiku kostnym dorosłych zwierząt znacznie ułatwia zautomatyzowana platforma zliczająca. Tego rodzaju platformy stanowią dopuszczalne rozwiązanie alternatywne wobec ręcznego przeprowadzania oceny (2). Wyniki badań porównawczych wskazują, że metody takie – przy wykorzystaniu odpowiednich wzorców kalibracyjnych – może doprowadzić do uzyskania lepszej odtwarzalności i czułości między- i wewnątrzlaboratoryjnej niż w przypadku ręcznego zliczania pod mikroskopem (3) (4). Wśród zautomatyzowanych systemów, które mogą być wykorzystywane do pomiaru częstości występowania erytrocytów zawierających mikrojądra, należy wymienić m.in. cytometry przepływowe (5), platformy analizy obrazowej (6) (7) oraz cytometry wykorzystujące technologię skaningu laserowego (8).

Fragmenty chromosomów można odróżnić od całych chromosomów, stosując szereg kryteriów, choć zazwyczaj nie dokonuje się tego w trakcie testu. Wśród wspomnianych kryteriów należy wymienić stwierdzenie występowania lub braku kinetochoru lub DNA centromerowego, które stanowią charakterystyczne elementy nienaruszonych chromosomów. Brak kinetochoru lub DNA centromerowego świadczy o tym, że mikrojądro zawiera wyłącznie fragmenty chromosomów, natomiast obecność tych elementów wskazuje na utratę chromosomu.

Definicje stosowanych terminów zamieszczono w dodatku 1.

▼M7

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

W ramach tego testu tkanką docelową do badania uszkodzeń genetycznych jest szpik kostny młodych dorosłych gryzoni, ponieważ w tej tkance wytwarzane są erytrocyty. Dopuszczalny jest pomiar mikrojąder w niedojrzałych erytrocytach w krwi obwodowej u innych gatunków ssaków, jeżeli wykazano czułość wystarczającą do wykrycia substancji chemicznych, które powodują strukturalne aberracje chromosomowe lub aberracje liczby w tych komórkach (przez indukcję mikrojąder w niedojrzałych erytrocytach) i jeżeli przedstawiono stosowne uzasadnienie naukowe. Głównym punktem końcowym jest częstość występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra. Częstość występowania w krwi obwodowej dojrzałych erytrocytów zawierających mikrojądra może również stanowić punkt końcowy w przypadku gatunku, który nie wykazuje ostrej selekcji komórek z mikrojądrami w śledzionie oraz w przypadku gdy zwierzęta są stale poddawane działaniu substancji chemicznej przez okres dłuższy niż cykl życia erytrocytu u danego gatunku (np. przez co najmniej 4 tygodnie w przypadku myszy).

Jeżeli istnieją dowody świadczące o tym, że badana(-e) substancja(-e) chemiczna(-e) lub jej (ich) metabolit(y) nie dotrą do tkanki docelowej, przeprowadzenie tego badania może nie być właściwe.

Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Taka analiza nie jest konieczna, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

ZASADA METODY BADAWCZEJ

Zwierzęta poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej z zastosowaniem odpowiedniej drogi narażenia. W przypadku wykorzystania szpiku kostnego zwierzęta uśmierca się w humanitarny sposób po upływie odpowiedniego czasu od podania substancji chemicznej, po czym pobiera się szpik kostny, sporządza się preparaty i barwi się je (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). W przypadku wykorzystania krwi obwodowej krew pobiera się po upływie odpowiedniego czasu od podania substancji chemicznej, po czym sporządza się preparaty i barwi się je (12) (16) (17) (18). Jeżeli substancję chemiczną podaje się w dawce ostrej, istotne jest, aby wybrać taki czas pobrania szpiku kostnego lub krwi, w którym będzie możliwe wykrycie indukcji erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra spowodowanej podaniem substancji chemicznej. W przypadku pobierania próbek krwi obwodowej musi również upłynąć dostateczny czas, aby takie erytrocyty pojawiły się we krwi. Preparaty analizuje się pod kątem obecności mikrojąder, stosując metody wizualizacji mikroskopowej, analizy obrazowej, cytometrii przepływowej albo laserowej cytometrii skaningowej.

WERYFIKACJA BIEGŁOŚCI LABORATORIUM

Badanie biegłości

Aby ustalić wystarczające doświadczenie laboratorium w zakresie omawianego testu przed zastosowaniem go w rutynowych badaniach, laboratorium powinno wykazać zdolność do odtworzenia oczekiwanych wyników na podstawie opublikowanych danych (17) (19) (20) (21) (22) w odniesieniu do częstości występowania mikrojąder z zastosowaniem co najmniej dwóch substancji służących do kontroli dodatniej (uwzględniając słabe reakcje wywołane niskimi dawkami substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej), takich jak substancje wymienione w tabeli 1, oraz z zastosowaniem kontroli ze zgodnym nośnikiem/rozpuszczalnikiem (zob. pkt 26). W tego rodzaju doświadczeniach należy stosować dawki, które prowadzą do powstania możliwych do odtworzenia i powiązanych z wielkością dawki przyrostów i które umożliwiają wykazanie czułości i zakresu oznaczania układu badawczego w odniesieniu do tkanki będącej przedmiotem zainteresowania (szpik kostny lub krew obwodowa) przy wykorzystaniu metody zliczania, która ma być stosowana w laboratorium. Wymóg ten nie dotyczy laboratoriów, które dysponują odpowiednim doświadczeniem, tj. laboratoriów prowadzących bazę danych historycznych, o której mowa w pkt 14–18.

Dane historyczne dotyczące kontroli

W toku badań biegłości laboratorium powinno ustalić:

— zakres i rozkład historycznych wyników kontroli dodatniej oraz

▼M7

— zakres i rozkład historycznych wyników kontroli ujemnej.

Przy pierwszym gromadzeniu danych dotyczących rozkładu historycznych wyników kontroli ujemnej wyniki jednoczesnej kontroli ujemnej powinny być zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli, o ile takie dane istnieją. W miarę dodawania kolejnych danych doświadczalnych do rozkładu danych historycznych dotyczących kontroli jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla tego rozkładu. Prowadzona przez dane laboratorium baza danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej powinna być statystycznie istotna, aby zapewnić zdolność laboratorium do oceny rozkładu własnych danych dotyczących kontroli ujemnej. Z literatury przedmiotu wynika, że baza danych powinna zawierać wyniki co najmniej 10 doświadczeń, ale najlepiej co najmniej 20 doświadczeń przeprowadzonych w porównywalnych warunkach doświadczalnych. Laboratoria powinny stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (23)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest „pod kontrolą”. Dalsze zalecenia dotyczące sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych (tj. kryteria włączania danych do zbioru danych historycznych i wykluczania danych z tego zbioru oraz kryteria dopuszczalności dla danego doświadczenia) można znaleźć w literaturze (24).

Jeżeli laboratorium nie przeprowadziło dostatecznie dużej liczby doświadczeń, aby ustalić istotny statystycznie rozkład danych z kontroli ujemnej (zob. pkt 15) w trakcie badań biegłości (opisanych w pkt 13), dopuszcza się możliwość ustalenia rozkładu w trakcie pierwszych rutynowych badań. Takie podejście powinno być zgodne z zaleceniami przedstawionymi w literaturze (24), a wyniki kontroli ujemnej uzyskane w ramach tych doświadczeń powinny pozostać zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli ujemnej.

Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem tego, czy ich wpływ na otrzymywane dane pozostaje spójny z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wyłącznie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli, w przypadku gdy z ekspertyzy wynika, że dane odbiegają od poprzedniego rozkładu (zob. pkt 15). Podczas tworzenia nowej bazy danych utworzenie kompletnej bazy danych dotyczących kontroli ujemnej może nie być konieczne do przeprowadzenia samego badania, o ile laboratorium może wykazać, że wartości uzyskiwane przez nie w ramach jednoczesnej kontroli ujemnej pozostają zgodne z wynikami zawartymi w jego poprzedniej bazie danych albo z odpowiednimi opublikowanymi danymi.

Dane dotyczące kontroli ujemnej powinny obejmować częstość występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra u każdego zwierzęcia. Jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla rozkładu danych zawartych w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej. W przypadku gdy dane dotyczące jednoczesnej kontroli ujemnej nie mieszczą się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 %, włączenie ich do rozkładu kontroli historycznej może być dopuszczalne, pod warunkiem że dane te nie stanowią skrajnych obserwacji nietypowych oraz że istnieją dowody świadczące o tym, iż dany układ badawczy znajduje się „pod kontrolą” (zob. pkt 15), a także nie ma dowodów wskazujących na błąd techniczny lub ludzki.

OPIS METODY

Przygotowania

Wybór gatunku zwierząt

Należy prowadzić badania na zdrowych, młodych, dorosłych zwierzętach pochodzących ze szczepów na ogół wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych. Można wykorzystać myszy, szczury lub inny odpowiedni gatunek ssaków. W przypadku wykorzystywania krwi obwodowej należy zapewnić, aby usuwanie komórek z mikrojądrami z krwiobiegu przez śledzionę nie zakłócało wykrywania indukowanych mikrojąder u wybranego gatunku. Zostało to wyraźnie wykazane

▼M7

w przypadku krwi obwodowej myszy i szczurów (2). W sprawozdaniu powinno się przedstawić naukowe uzasadnienie wykorzystania gatunków innych niż szczury i myszy. W przypadku wykorzystywania zwierząt innych niż gryzonie zaleca się włączenie pomiaru indukowanych mikrojąder do innego stosownego badania toksyczności.

Warunki utrzymywania i karmienia

W przypadku gryzoni temperatura w pomieszczeniu dla zwierząt powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 40 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza okresami czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne z zachowaniem cyklu 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne oraz należy zapewnić zwierzętom nieograniczony dostęp do wody do picia. Wybór paszy może zależeć od potrzeby zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej, jeżeli jest ona podawana tą drogą. Gryzonie należy trzymać w małych grupach (nie więcej niż pięć sztuk) składających się ze zwierząt tej samej płci i należących do tej samej grupy badanej, jeżeli nie przewiduje się, że mogłoby dojść do agresywnego zachowania, najlepiej w klatkach z pełną podłogą, oraz zapewnić im odpowiednie urozmaicenie warunków bytowania. Zwierzęta można utrzymywać pojedynczo tylko wtedy, gdy ma to uzasadnienie naukowe.

Przygotowanie zwierząt

Zazwyczaj wykorzystuje się zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta (w przypadku gryzoni najlepiej w wieku 6–10 tygodni na początku poddawania działaniu substancji chemicznej, chociaż dopuszcza się również używanie nieco starszych zwierząt), które losowo przydziela się do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu substancji chemicznej. Zwierzęta zostają indywidualnie oznakowane przy użyciu humanitarnej, mało inwazyjnej metody (np. poprzez obrączkowanie, kolczykowanie, wszczepianie mikroukładów i identyfikację biometryczną, ale nie przycinanie uszu lub palców) i aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez co najmniej pięć dni. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Należy unikać zanieczyszczenia krzyżowego kontrolą dodatnią i badaną substancją chemiczną. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać ± 20 % średniej masy dla każdej płci.

Przygotowanie dawek

Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuszczać lub przygotowywać w postaci zawiesiny w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach lub dodawać do paszy lub wody do picia przed podaniem dawki zwierzętom. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym mogą być dawkowane bezpośrednio lub można je rozcieńczać przed dawkowaniem. W przypadku narażenia inhalacyjnego badane substancje chemiczne można podawać w postaci gazu, pary lub stałych/ciekłych aerozoli, w zależności od ich właściwości fizykochemicznych. Należy stosować świeże preparaty badanej substancji chemicznej, chyba że z danych dotyczących stabilności wynika, iż przechowywanie tych preparatów jest dopuszczalne, i chyba że w danych tych określono warunki prawidłowego przechowywania takich preparatów.

Warunki badania

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem

Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien wywoływać efektów toksycznych przy stosowanych poziomach dawek oraz nie powinien być w stanie wchodzić w reakcję chemiczną z badanymi substancjami chemicznymi. Jeśli wykorzystywane są inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki, ich włączenie do doświadczenia powinno być poparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć zastosowanie wodnego rozpuszczalnika/nośnika. Wśród przykładów powszechnie wykorzystywanych zgodnych rozpuszczalników/nośników można wymienić wodę, sól fizjologiczną, roztwór metylocelulozy, roztwór soli sodowej karboksymetylocelulozy, oliwę z oliwek i olej kukurydziany. W przypadku braku historycznych lub opublikowanych danych dotyczących kontroli wskazujących, że wybrany nietypowy rozpuszczalnik/nośnik nie indukuje mikrojąder ani nie powoduje żadnego innego szkodliwego efektu, należy wykonać badanie wstępne w celu ustalenia dopuszczalności stosowania kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem.

▼M7

Kontrole

Kontrole dodatnie

W każdym badaniu należy co do zasady uwzględnić grupę zwierząt otrzymującą substancję chemiczną służącą do kontroli dodatniej. Od tego obowiązku można odstąpić, jeżeli laboratorium badawcze wykaże biegłość w przeprowadzaniu takiego badania i ustanowi zakres historycznych wyników kontroli dodatniej. W przypadku nieuwzględnienia jednoczesnej kontroli dodatniej do każdego doświadczenia należy włączyć kontrolę na potrzeby oceny ilościowej (utrwalone i niebarwione preparaty lub próbki zawiesiny komórek – stosownie do metody oceny ilościowej). Tego rodzaju kontrole można przeprowadzić, włączając do oceny ilościowej wyników badania odpowiednie próbki referencyjne, które zostały pozyskane w trakcie odrębnego przeprowadzanego okresowo (np. co 6–18 miesięcy) doświadczenia z wykorzystaniem kontroli dodatniej i które są przechowywane; na przykład w trakcie badania biegłości i – w stosownych przypadkach – w regularnych odstępach czasu w późniejszym okresie.

Substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej powinny w przewidywalny sposób generować zauważalny wzrost częstości występowania mikrojąder w porównaniu z częstością samorzutną. W przypadku ręcznego zliczania pod mikroskopem dawki stosowane do celów kontroli dodatniej należy dobierać w taki sposób, aby efekty były jasne, lecz aby osoba zliczająca nie była w stanie natychmiast zidentyfikować zakodowanych próbek. Dopuszcza się, aby substancja chemiczna służąca do kontroli dodatniej była podawana inną drogą niż badana substancja chemiczna i zgodnie z innym harmonogramem podawania substancji chemicznej, a także aby próbki były pobierane wyłącznie w określonym czasie. Ponadto w stosownych przypadkach można rozważyć możliwość zastosowania substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej powiązanych z określoną klasą chemiczną. W tabeli 1 przedstawiono przykładowe substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej.

Tabela 1

Przykładowe substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej

Substancje chemiczne i nr CAS
Metanosulfonian etylu [nr CAS 62-50-0]
Metanosulfonian metylu [nr CAS 66-27-3]
Etylonitrozomocznik [nr CAS 759-73-9]
Mitomycyna C [nr CAS 50-07-7]
Cyklofosfamid (monohydrat) [nr CAS 50-18-0 (nr CAS 6055-19-2)]
Trietylenomelamina [nr CAS 51-18-3]
Kolchicyna [nr CAS 64-86-8] lub winblastyna [nr CAS 865-21-4] – jako aneugeny

Kontrole ujemne

Od zwierząt z grupy kontrolnej ujemnej należy pobierać próbki w każdym okresie pobierania próbek i należy postępować z nimi w taki sam sposób, jak ze zwierzętami należącymi do grupy badanej, z tym że nie poddaje się ich działaniu badanej substancji chemicznej. Jeżeli do podania badanej substancji chemicznej wykorzystuje się rozpuszczalnik/nośnik, zwierzętom należącym do grupy kontrolnej również należy podać ten rozpuszczalnik/nośnik. Jeżeli jednak dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej gromadzone przez laboratorium badawcze przy każdorazowym pobieraniu próbek będą wskazywały na stały poziom zmienności pomiędzy zwierzętami i stałą częstość występowania komórek z mikrojądrami, konieczne może być tylko jedno pobranie próbek na potrzeby kontroli ujemnej. Jeżeli w ramach kontroli ujemnej przeprowadza się tylko jedno pobieranie próbek, próbki należy pobrać w pierwszym okresie pobierania próbek w ramach badania.

▼M7

Jeżeli wykorzystywana jest krew obwodowa, w przypadku badań krótkoterminowych dopuszczalna może być również próbka przed podaniem substancji chemicznej zamiast jednoczesnej kontroli ujemnej, jeżeli dane wynikające z badania są spójne z bazą danych historycznych dotyczących kontroli prowadzoną przez dane laboratorium badawcze. W odniesieniu do szczurów wykazano, że pobieranie niewielkich próbek (np. poniżej 100 µl/dzień) przed podaniem substancji chemicznej ma minimalny wpływ na podstawową częstość występowania mikrojąder (25).

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

Na ogół reakcja mikrojądrowa jest podobna u samców i samic, w związku z czym większość badań można prowadzić na zwierzętach dowolnej płci (26). Dane wskazujące na występowanie istotnych różnic między samcami i samicami (np. różnice w toksyczności ogólnoustrojowej, metabolizmie, biodostępności, toksyczności w szpiku kostnym itd., w tym np. w badaniu ustalającym zakres dawkowania) stanowią przesłankę przemawiającą za przeprowadzaniem badań na zwierzętach obu płci. W takim przypadku właściwe może być przeprowadzenie badania na zwierzętach obu płci, np. w ramach badania toksyczności dawki powtórzonej. Zastosowanie planu czynnikowego może być wskazane, jeżeli do badania używa się zwierząt obu płci. Szczegółowe informacje dotyczące sposobu analizy danych z wykorzystaniem tego planu można znaleźć w dodatku 2.

Na początku badania należy ustalić liczebność grup w celu zapewnienia w każdej grupie co najmniej 5 nadających się do poddania analizie zwierząt jednej płci lub każdej płci, jeżeli wykorzystuje się zwierzęta obu płci. Jeżeli narażenie człowieka na działanie substancji chemicznych może mieć charakter uzależniony od płci, jak to na przykład ma miejsce w przypadku niektórych produktów leczniczych, badanie należy przeprowadzić na zwierzętach odpowiedniej płci. Wskazówka odnośnie do maksymalnych typowych wymagań w zakresie liczby zwierząt – w przypadku badania szpiku kostnego prowadzonego zgodnie z parametrami ustalonymi w pkt 37 z trzema grupami otrzymującymi dawki i jednoczesną kontrolą ujemną i dodatnią (każda grupa złożona z pięciu zwierząt jednej płci) wymagane byłoby użycie 25–35 zwierząt.

Poziomy dawek

W przypadku przeprowadzenia wstępnego badania ustalającego zakres dawkowania ze względu na brak dostępnych odpowiednich danych umożliwiających dobranie dawki, badanie takie należy wykonać w tym samym laboratorium z wykorzystaniem tego samego gatunku, szczepu, płci i schematu podawania substancji chemicznej, jakie mają być stosowane w badaniu głównym (27). Celem badania powinno być określenie maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) zdefiniowanej jako najwyższa dawka tolerowana bez wywoływania objawów toksyczności ograniczającej badanie w stosunku do czasu trwania badania (na przykład dawka wywołująca spadek masy ciała lub cytotoksyczność układu krwiotwórczego, ale niepowodująca śmierci lub objawów bólu, cierpienia lub stresu, które wiązałyby się z koniecznością uśmiercenia zwierzęcia w humanitarny sposób (28)).

Najwyższą dawkę można również zdefiniować jako dawkę, która wywołuje toksyczność w szpiku kostnym (np. redukcję odsetka niedojrzałych erytrocytów wśród erytrocytów ogółem w szpiku kostnym lub krwi obwodowej o ponad 50 %, ale do poziomu nie niższego niż 20 % wartości kontrolnej). Niemniej podczas analizowania komórek CD71-pozytywnych w krążeniu obwodowym (tj. za pomocą cytometrii przepływowej) ta bardzo młoda frakcja niedojrzałych erytrocytów szybciej reaguje na narażenie na substancję toksyczną niż większa RNA-pozytywna kohorta niedojrzałych erytrocytów. Wyższa toksyczność pozorna może być zatem widoczna w planach narażenia ostrego, w których bada się frakcję CD71-pozytywnych niedojrzałych erytrocytów, w porównaniu z planami, w których identyfikuje się niedojrzałe erytrocyty na podstawie zawartości RNA. Dlatego jeżeli w doświadczeniach podaje się substancję chemiczną przez pięć lub mniej dni, najwyższy poziom dawki badanej substancji chemicznej powodujący toksyczność można określić jako dawkę, która wywołuje statystycznie istotny spadek odsetka CD71-pozytywnych niedojrzałych erytrocytów wśród erytrocytów ogółem, ale do poziomu nie niższego niż 5 % wartości kontrolnej (29).

▼M7

Substancje chemiczne wykazujące intensywne parametry toksykokinetyczne lub wywołujące procesy detoksykacji, które mogą prowadzić do zmniejszenia narażenia po długim okresie podawania substancji chemicznej, mogą stanowić wyjątki w odniesieniu do kryteriów ustalania dawki i powinny być oceniane na zasadzie jednostkowych przypadków.

Aby uzyskać informacje na temat zależności dawka-odpowiedź, w kompletnym badaniu należy uwzględnić grupę kontrolną ujemną oraz co najmniej trzy poziomy dawek, przy czym każda kolejna dawka jest większa od poprzedniej na ogół dwukrotnie, ale nie więcej niż czterokrotnie. Jeżeli wyniki badania ustalającego zakres dawkowania lub istniejące dane będą wskazywały, że badana substancja chemiczna nie wywołuje toksyczności, najwyższa dawka w przypadku okresu podawania wynoszącego 14 dni lub więcej powinna wynosić 1 000 mg/kg masy ciała na dobę, a w przypadku okresów podawania wynoszących mniej niż 14 dni powinna wynosić 2 000 mg/kg masy ciała na dobę. Jeżeli jednak badana substancja chemiczna będzie miała działanie toksyczne, maksymalną tolerowaną dawkę należy ustalić na poziomie odpowiadającym najwyższej podanej dawce, przy czym najlepiej byłoby, gdyby zastosowane poziomy dawek obejmowały zakres od dawki maksymalnej do dawki wywołującej toksyczność w niewielkim stopniu lub dawki niewywołującej toksyczności. W przypadku zaobserwowania toksyczności w tkance docelowej (szpiku kostnym) przy wszystkich badanych poziomach dawek zaleca się dalsze badania z wykorzystaniem dawek nietoksycznych. W przypadku badań przeprowadzanych w celu uzyskania bardziej szczegółowych ilościowych informacji na temat zależności dawka-odpowiedź konieczne może okazać się utworzenie dodatkowych grup otrzymujących dawki. Wspomniane wartości graniczne mogą różnić się w przypadku niektórych rodzajów badanych substancji chemicznych (np. produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi), które podlegają szczególnym wymogom.

Badanie graniczne

Jeżeli wyniki badania ustalającego zakres dawkowania lub dostępne dane na temat powiązanych szczepów zwierząt będą wskazywały, że poddanie zwierząt działaniu substancji chemicznej w stężeniu odpowiadającym co najmniej dawce granicznej (o której mowa poniżej) nie wywołuje żadnych możliwych do zaobserwowania efektów toksycznych (uwzględniając brak spadku tempa dzielenia się komórek szpiku kostnego lub brak innych dowodów świadczących o cytotoksyczności tkanki docelowej), i jeżeli wyniki badań genotoksyczności *in vitro* lub dane dotyczące strukturalnie powiązanych substancji chemicznych nie będą wskazywały na możliwość wystąpienia genotoksyczności, przeprowadzenie pełnego badania z trzema poziomami dawek może nie być konieczne, o ile wykazano, że badane substancje chemiczne docierają do tkanki docelowej (szpiku kostnego). W takich przypadkach pojedynczy poziom dawki, odpowiadający dawce granicznej, może być wystarczający. Jeżeli okres podawania wynosi co najmniej 14 dni, dawka graniczna wynosi 1 000 mg/kg masy ciała na dobę. W przypadku okresów podawania poniżej 14 dni dawka graniczna wynosi 2 000 mg/kg masy ciała na dobę.

Podawanie dawek

Planując badanie, należy wziąć pod uwagę przewidywaną drogę narażenia ludzi. W związku z tym można wybrać jako uzasadnione takie drogi podawania jak: w pokarmie, z wodą do picia, miejscowe, podskórne, dożylne, ustne (przez sondę), przez wdychanie, dotchawicze lub przez implantację. W każdym razie drogę narażenia należy dobrać w taki sposób, aby zapewnić odpowiednie narażenie tkanek docelowych. Nie zaleca się na ogół dokonywania wstrzyknięć dootrzewnowych, ponieważ nie jest to typowa droga narażenia ludzi – taką drogę należy stosować wyłącznie w przypadku wystąpienia konkretnego uzasadnienia naukowego. Jeżeli badaną substancję chemiczną dodaje się do paszy lub wody do picia, w szczególności w przypadku pojedynczej dawki substancji, należy upewnić się, że okres między spożyciem paszy i wody a pobraniem próbki jest wystarczający do tego, aby zapewnić możliwość wykrycia skutków podania substancji (zob. pkt 37). Maksymalna objętość płynu, jaką można podać przez sondę lub wstrzyknąć jednorazowo, zależy od wielkości zwierzęcia doświadczalnego. Objętość ta nie powinna co do zasady przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można zastosować maksymalnie 2 ml/100 g masy ciała. Wykorzystanie objętości wyższych niż podane musi być uzasadnione. Należy ograniczyć zmienność objętości stosowanej w badaniu, dostosowując stężenie w taki sposób, by zapewnić podawanie substancji chemicznej w takiej samej objętości w stosunku do masy ciała przy wszystkich poziomach dawek – nie dotyczy to jednak badanych substancji chemicznych o podrażniającym lub żrącym działaniu, które w normalnych warunkach wywołują poważniejsze skutki w przypadku ich podania w wyższych stężeniach.

▼M7

Harmonogram podawania substancji chemicznej

Najlepiej podawać co najmniej dwie dawki w odstępach 24-godzinnych, szczególnie w przypadku włączenia tego badania do innych badań toksyczności. W innym przypadku można stosować pojedynczą dawkę, jeżeli ma to uzasadnienie naukowe (np. jeżeli wiadomo, że badane substancje chemiczne blokują cykl komórkowy). Badane substancje chemiczne mogą być również podawane jako dawka dzielona, tj. co najmniej dwa podania substances tego samego dnia w odstępie czasu nie większym niż 2–3 godziny, aby łatwiej było podawać substancję w dużej objętości. W takim przypadku lub przy podawaniu badanej substancji chemicznej drogą wziewną okres pobierania próbek należy zaplanować w oparciu o czas podania ostatniej dawki lub czas ustania narażenia na działanie substancji.

Badanie można przeprowadzić na myszach lub szczurach na jeden z trzech sposobów:

a. zwierzęta są jednorazowo poddawane działaniu badanej substancji chemicznej. Próbki szpiku kostnego pobiera się przynajmniej dwukrotnie (z odrębnych grup zwierząt), rozpoczynając nie wcześniej niż 24 godziny po podaniu substancji chemicznej, ale nie później niż 48 godzin po podaniu, z zachowaniem odpowiednich odstępów czasu między pobieraniem próbek, chyba że wiadomo, iż badana substancja chemiczna ma wyjątkowo długi okres półtrwania. Pobranie próbek przed upływem 24 godzin po podaniu substancji chemicznej wymaga uzasadnienia. Próbki krwi obwodowej pobiera się przynajmniej dwukrotnie (z tej samej grupy zwierząt), rozpoczynając nie wcześniej niż 36 godzin po podaniu substancji chemicznej, ale nie później niż 72 godziny po podaniu, z zachowaniem odpowiedniego(-ch) odstępu(-ów) po pobraniu pierwszej próbki. Przy pierwszym pobraniu próbek wszystkie grupy otrzymujące dawki powinny zostać poddane działaniu substancji chemicznej, po czym należy pobrać próbki do analizy; w kolejnych okresach pobierania próbek należy jednak podawać wyłącznie najwyższą dawkę. Jeżeli po jednym pobraniu próbek zostanie rozpoznana reakcja dodatnia, dodatkowe pobieranie próbek nie jest wymagane, chyba że potrzebne są ilościowe informacje o zależności dawka-odpowiedź. Opisane czasy pobrania wynikają z kinetyki pojawiania się i zanikania mikrojąder w tych dwóch przedziałach tkanek;

b. jeżeli substancja chemiczna jest podawana dwa razy dziennie (np. dwie dawki w 24-godzinnych odstępach czasu), próbki należy pobrać jednorazowo między 18 a 24 godziną po ostatnim podaniu substancji chemicznej w przypadku szpiku kostnego lub między 36 a 48 godziną po ostatnim podaniu substancji chemicznej w przypadku krwi obwodowej (30). Opisane czasy pobrania wynikają z kinetyki pojawiania się i zanikania mikrojąder w tych dwóch przedziałach tkanek;

c. jeżeli substancja chemiczna jest podawana co najmniej trzy razy dziennie (np. co najmniej trzy dawki w około 24-godzinnych odstępach), próbki szpiku kostnego należy pobrać nie później niż 24 godziny po ostatnim podaniu substancji chemicznej, a próbki krwi obwodowej należy pobrać nie później niż 40 godzin po ostatnim podaniu substancji chemicznej (31). Ten wariant podawania substancji chemicznej uwzględnia połączenie testu kometowego (np. pobieranie próbek po 2–6 godzinach od podania ostatniej dawki) z testem mikrojądrowym oraz włączenie testu mikrojądrowego do badania toksyczności dawki powtórzonej. Zgromadzone dane wykazywały, że indukcję mikrojąder można zaobserwować w takich szerszych ramach czasowych, jeżeli substancję podano co najmniej 3-krotnie (15).

Inne schematy dawkowania lub pobierania próbek można wykorzystywać w stosownych przypadkach i jeżeli jest to naukowo uzasadnione, jak również w celu ułatwienia włączenia tego badania do innych badań toksyczności.

Obserwacje

Ogólne obserwacje kliniczne zwierząt doświadczalnych wraz z rejestrowaniem objawów klinicznych powinny odbywać się co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze oraz z uwzględnieniem szczytowego okresu przewidywanych skutków po dawkowaniu. Co najmniej dwa razy dziennie w trakcie okresu dawkowania wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane pod kątem zachorowalności i upadkowości. Wszystkie zwierzęta powinny być ważone na początku badania, co najmniej raz w tygodniu w trakcie badań dawki

▼M7

powtórzonej oraz po uśmierceniu. W przypadku badań trwających co najmniej tydzień co najmniej raz w tygodniu należy dokonywać pomiaru ilości spożytego pokarmu. Jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie do picia, należy mierzyć spożycie wody przy każdej zmianie wody i co najmniej raz w tygodniu. Zwierzęta, u których stwierdzono oznaki podwyższonej toksyczności nieprowadzące do śmierci, należy uśmiercić w humanitarny sposób przed zakończeniem okresu badania (28). W pewnych okolicznościach można monitorować temperaturę ciała zwierząt, ponieważ hipertermia i hipotermia wywołane podaniem substancji chemicznej przyczyniły się do otrzymania błędnych wyników (32) (33) (34).

Narażenie tkanki docelowej

W odpowiednim momencie badania należy pobrać próbkę krwi, aby zbadać poziomy osocza po zastosowaniu badanych substancji chemicznych celem wykazania, że doszło do narażenia szpiku kostnego, jeżeli będzie to zasadne i jeżeli nie istnieją żadne inne dane dotyczące narażenia (zob. pkt 48).

Przygotowanie szpiku kostnego/krwi

Komórki szpiku kostnego pobiera się zazwyczaj z kości udowych lub piszczelowych natychmiast po uśmierceniu zwierząt w humanitarny sposób. Na ogół komórki są usuwane z kości, preparowane i barwione z zastosowaniem uznanych metod. Niewielkie objętości krwi obwodowej można uzyskać, zgodnie z właściwymi standardami w zakresie dobrostanu zwierząt, przy użyciu metody umożliwiającej przeżycie zwierzęcia doświadczalnego, takiej jak spowodowanie krwawienia z żyły ogonowej lub innego odpowiedniego naczynia krwionośnego, albo poprzez nakłucie serca lub pobranie próbek z dużego naczynia krwionośnego podczas uśmiercania zwierzęcia. W przypadku erytrocytów pozyskiwanych zarówno ze szpiku kostnego, jak i z krwi obwodowej, w zależności od metody analizy, komórki można niezwłocznie poddać natychmiastowemu barwieniu (16) (17) (18), można z nich sporządzać preparaty wymazowe, a następnie barwić je do celów analizy mikroskopowej, lub można utrwalać je i barwić odpowiednio do celów analizy opartej na cytometrii przepływowej. Wykorzystanie barwnika specyficznego dla DNA [np. oranżu akrydyny (35) lub Hoechst 33258 plus pyroniny-Y (36)] może wyeliminować niektóre spośród artefaktów związanych ze stosowaniem barwnika niebędącego barwnikiem specyficznym dla DNA. Zaleta ta nie uniemożliwia zastosowania zwykłych barwników (np. metody Giemsy na potrzeby analizy mikroskopowej). Można wykorzystać również dodatkowe systemy [np. kolumny celulozowe mające na celu usunięcie komórek jądrowych (37) (38)], pod warunkiem że wykazano zgodność tych systemów z przygotowywaniem próbek w laboratorium.

Na potrzeby określenia charakteru mikrojąder (chromosom/fragment chromosomu) w celu ustalenia, czy mechanizm indukcji mikrojąder jest spowodowany aktywnością klastogenną czy aneugenną, można zastosować przeciwciała antykinetochorowe (39), FISH z sondami molekularnymi specyficznymi dla pancentromerów (40) lub syntezę *in situ* przy udziale startera ze starterami specyficznymi dla pancentromerów, wraz z odpowiednim barwieniem kontrastowym DNA (41), w przypadku gdy metody te mają zastosowanie. Inne metody rozróżnienia klastogenów i aneugenów można stosować, o ile okazały się skuteczne.

Analiza (ręczna i automatyczna)

Wszystkie preparaty lub próbki do analizy, w tym te stanowiące kontrolę dodatnią i ujemną, należy indywidualnie zakodować przed rozpoczęciem jakiejkolwiek analizy i zrandomizować, tak aby osoba ręcznie zliczająca nie znała warunków podawania substancji chemicznej; takie kodowanie nie jest koniecznie w przypadku stosowania automatycznych systemów zliczania, które nie opierają się na kontroli wizualnej i nie są podatne na stronniczość osoby przeprowadzającej analizę. Odsetek niedojrzałych erytrocytów wśród ogółu (dojrzałych i niedojrzałych) erytrocytów jest oznaczany w odniesieniu do każdego zwierzęcia poprzez zliczenie ogółem co najmniej 500 erytrocytów w przypadku szpiku kostnego oraz 2 000 erytrocytów w przypadku krwi obwodowej (42). Aby ustalić częstość występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra, należy zliczyć co najmniej 4 000 niedojrzałych erytrocytów na zwierzę (43). Jeżeli informacje przechowywane w bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej wskazują, że średnia podstawowa częstość występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra w danym laboratorium badawczym jest niższa niż 0,1 %, należy rozważyć możliwość oceny ilościowej dodatkowych komórek. W trakcie analizy próbek odsetek niedojrzałych erytrocytów wśród erytrocytów ogółem u zwierząt poddawanych działaniu

▼M7

substancji chemicznej nie powinien być niższy niż 20 % odsetka odnotowanego w kontroli z nośnikiem/rozpuszczalnikiem, w przypadku gdy stosowane jest zliczanie pod mikroskopem, oraz nie powinien być niższy niż około 5 % odsetka odnotowanego w kontroli z nośnikiem/rozpuszczalnikiem, w przypadku gdy stosowane jest zliczanie CD71-pozytywnych niedojrzałych erytrocytów metodami cytometrycznymi (zob. pkt 31) (29). Na przykład jeżeli w przypadku oznaczania erytrocytów w szpiku kostnym pod mikroskopem odsetek niedojrzałych erytrocytów w szpiku kostnym w grupie kontrolnej wynosi 50 %, górna granica toksyczności będzie wynosiła 10 % niedojrzałych erytrocytów.

Ze względu na fakt, że śledziona szczura wchłania i niszczy erytrocyty zawierające mikrojądra, w celu utrzymania wysokiego poziomu czułości badania podczas analizy krwi obwodowej szczura preferowane jest ograniczenie analizy erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra do najmłodszej frakcji. Przy stosowaniu automatycznych metod analizy te najbardziej niedojrzałe erytrocyty można zidentyfikować w oparciu o ich wysoką zawartość RNA, czyli wysoki poziom receptorów transferyny (CD71-pozytywnych) obecnych na ich powierzchni (31). Bezpośrednie porównanie różnych metod barwienia wykazało jednak, że zadowalające wyniki można uzyskać przy użyciu różnych metod, w tym konwencjonalnego barwienia oranżem akrydyny (3) (4).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

Dane dotyczące poszczególnych zwierząt należy przedstawić w postaci tabeli. Liczbę zliczonych niedojrzałych erytrocytów, liczbę erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra oraz odsetek niedojrzałych erytrocytów wśród erytrocytów ogółem należy wymienić oddzielnie w odniesieniu do każdego zwierzęcia poddanego analizie. Jeżeli myszy są poddawane działaniu substancji chemicznej nieprzerwanie przez co najmniej cztery tygodnie, należy również podać dane dotyczące liczby i odsetka dojrzałych erytrocytów zawierających mikrojądra, jeżeli zgromadzono takie dane. Należy również zgłosić dane dotyczące toksyczności u zwierząt i objawów klinicznych.

Kryteria dopuszczalności

Dopuszczalność badania ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

a. Uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących jednoczesnej kontroli ujemnej do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli (zob. pkt 15–18).

b. jednoczesne kontrole dodatnie lub kontrole na potrzeby oceny ilościowej powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną (zob. pkt 24–25);

c. objęto analizą odpowiednią liczbę dawek i komórek.

d. kryteria wyboru najwyższej dawki są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 30–33.

Ocena i interpretacja wyników

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli:

a. co najmniej jedna z grup badanych wykazuje statystycznie istotny wzrost częstości występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,

b. ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany z dawką w co najmniej jednym okresie pobierania próbek, oraz

c. którykolwiek z otrzymanych wyników znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona;

▼M7

Jeżeli w danym okresie pobierania próbek bada się wyłącznie najwyższą dawkę, badaną substancję chemiczną uznaje się za dającą wynik wyraźnie dodatni, jeżeli odnotowano statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną, a wyniki znajdują się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona). Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można znaleźć w literaturze (44) (45) (46) (47). Przy przeprowadzaniu analizy dawka-odpowiedź należy zbadać co najmniej trzy grupy otrzymujące dawkę, które poddano działaniu substancji chemicznej. W badaniach statystycznych należy przyjąć, że jednostką doświadczalną jest zwierzę. Wyniki dodatnie testu mikrojądrowego wskazują, że badana substancja chemiczna indukuje mikrojądra, które są wynikiem aberracji chromosomowej lub uszkodzenia aparatu mitotycznego erytroblastów gatunku doświadczalnego. W przypadku gdy badanie przeprowadzono w celu wykrycia centromerów w mikrojądrach, jeżeli badana substancja chemiczna powoduje tworzenie się mikrojąder zawierających centromery (DNA centromerowe lub kinetochor, co wskazuje na utratę całego chromosomu), stanowi to dowód, że badana substancja chemiczna jest aneugenem.

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych:

a. w żadnej grupie badanej nie odnotowano statystycznie istotnego wzrostu częstości występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,

b. ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany z dawką w żadnym okresie pobierania próbek,

c. wszystkie wyniki mieszczą się w rozkładzie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona), oraz

d. doszło do narażenia szpiku kostnego na działanie badanej substancji chemicznej lub badanych substancji chemicznych.

Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można znaleźć w literaturze (44) (45) (46) (47). Za dowody świadczące o narażeniu szpiku kostnego na działanie badanej substancji chemicznej można uznać spadek stosunku erytrocytów niedojrzałych do dojrzałych lub wyniki pomiaru stężenia badanej substancji chemicznej w osoczu lub we krwi. Jeżeli substancję chemiczną podano drogą dożylną, przedstawienie dowodów narażenia na działanie substancji chemicznej nie jest konieczne. Ewentualnie narażenie szpiku kostnego na działanie substancji chemicznej można wykazać w oparciu o dane dotyczące wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania pozyskane w ramach niezależnego badania przeprowadzonego z zastosowaniem tej samej drogi i na tych samych gatunkach. Wyniki ujemne świadczą o tym, że w warunkach badania badana substancja chemiczna nie indukuje mikrojąder w niedojrzałych erytrocytach gatunków doświadczalnych.

Weryfikacja wyraźnie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

Jeżeli reakcja nie jest ani wyraźnie ujemna, ani wyraźnie dodatnia oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku (np. niewielki lub graniczny wzrost), dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub wyniki dalszych badań przeprowadzonych w ramach już zakończonych doświadczeń. W niektórych przypadkach warto rozważyć możliwość zbadania większej liczby komórek lub powtórzenia doświadczenia w zmienionych warunkach doświadczalnych.

W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskane dane uniemożliwią wyciągnięcie wniosku, iż badana substancja chemiczna daje wyniki dodatnie albo ujemne i w takiej sytuacji badanie zostanie uznane za niejednoznaczne.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Podsumowanie

Badana substancja chemiczna:

— źródło, numer partii, data graniczna do użytku, jeżeli jest dostępna;

▼M7

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej:

— uzasadnienie wyboru nośnika;

— rozpuszczalność oraz stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli są znane;

— przygotowanie postaci użytkowych przeznaczonych do spożycia w paszy i z wodą do picia lub w formie wziewnej;

— oznaczenie analityczne postaci użytkowych (np. stabilność, jednorodność, stężenia nominalne), jeżeli jest przeprowadzane.

Zwierzęta doświadczalne:

— gatunek/szczep wykorzystywany w badaniu wraz z uzasadnieniem jego wyboru;

— liczba, wiek i płeć zwierząt;

— źródło, warunki utrzymywania, pasza itp.;

— metoda indywidualnego znakowania zwierząt;

— w przypadku badań krótkoterminowych: masa ciała poszczególnych zwierząt na początku i na końcu badania; w przypadku badań trwających dłużej niż jeden tydzień: masa ciała poszczególnych zwierząt w trakcie badania oraz informacje o spożyciu pokarmu. W odniesieniu do każdej grupy należy uwzględnić informacje o zakresie masy ciała oraz o średniej i odchyleniu standardowym.

Warunki badania:

— dane dotyczące kontroli dodatnich i ujemnych (z rozpuszczalnikiem/nośnikiem);

— dane zgromadzone w ramach badania ustalającego zakres dawkowania, jeżeli zostało przeprowadzone;

— uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania;

— szczegółowe informacje dotyczące przygotowania badanej substancji chemicznej;

— szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej;

— uzasadnienie drogi podawania i długości okresu podawania;

— metody stosowane w celu sprawdzenia, czy badane substancje chemiczne dostały się do krwiobiegu lub dotarły do tkanki docelowej;

▼M7

— dawka faktyczna (mg/kg masy ciała na dobę) obliczona w oparciu o stężenie badanej substancji chemicznej w paszy / wodzie do picia (ppm) i spożycie, w stosownych przypadkach;

— szczegółowe informacje dotyczące jakości pokarmu i wody;

— metoda uśmiercenia;

— metoda analgezji (jeżeli jest stosowana);

— szczegółowy opis harmonogramów podawania substancji chemicznej i pobierania próbek oraz ich uzasadnienie;

— metody przygotowywania preparatów;

— procedury izolowania i konserwacji próbek;

— metody pomiaru toksyczności;

— kryteria zliczania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra;

— liczba zbadanych komórek na zwierzę w celu ustalenia częstości występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra oraz odsetka niedojrzałych erytrocytów w stosunku do dojrzałych;

— kryteria dopuszczalności badania;

— metody, takie jak stosowanie przeciwciał antykinetochorowych lub sond molekularnych specyficznych dla centromerów w celu określenia, w stosownych przypadkach, czy mikrojądra zawierają całe chromosomy czy fragmenty chromosomów.

Wyniki:

— stan zwierząt przed badaniem i podczas całego okresu badania, w tym oznaki toksyczności;

— odsetek niedojrzałych erytrocytów wśród erytrocytów ogółem;

— liczba erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra podawana osobno dla każdego zwierzęcia;

— średnia ± odchylenie standardowe erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra na grupę;

— w stosownych przypadkach zależność dawka-odpowiedź;

— zastosowane analizy i metody statystyczne;

— dane dotyczące jednoczesnej kontroli ujemnej i jednoczesnej kontroli dodatniej wraz z zakresami, średnimi oraz odchyleniami standardowymi;

— dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej i dodatniej wraz z zakresami, średnimi i odchyleniami standardowymi oraz granice kontrolne wyznaczające przedział 95 % dla rozkładu, w tym czas objęty obserwacją oraz liczba punktów danych;

— dane potwierdzające, że doszło do narażenia szpiku kostnego na działanie substancji chemicznej;

— dane dotyczące cech charakterystycznych wskazujące, czy mikrojądra zawierają całe chromosomy czy fragmenty chromosomów, jeżeli ma to zastosowanie;

— spełnione kryteria pozwalające uznać reakcję za dodatnią lub ujemną.

▼M7

Omówienie wyników.

Wniosek.

Bibliografia.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015, Publikacje OECD na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny, nr 234, OECD, Paryż.

(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, t. 627/1, s. 10–30.

(3) MacGregor, J.T.*et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronucleet al peripheral blood reticulocytes:II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, t. 94/1, s. 92–107.

(4) Dertinger, S.D. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronucleet al peripheral blood reticulocytes:I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, t. 94/1, s. 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, t. 26/1, s. 139–145.

(6) Parton, J.W., W.P.Hoffman, M.L.Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, t. 370/1, s. 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, t. 404/1–2, s. 149–154.

(8) Styles, J.A.*et al.* (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, t. 44/2, s. 153–155.

(9) Heddle, J.A.(1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, t. 18/2, s. 187–190.

(10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, t. 31/1, s. 9–15.

(11) Heddle, J.A.*et al.* (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity.Sprawozdanie amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska dotyczące programu Gene-Tox, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, t. 123/1, s. 61–118.

(12) Mavournin, K.H.*et al.* (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood.Sprawozdanie amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska dotyczące programu Gene-Tox, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, t. 239/1, s. 29–80.

(13) MacGregor, J.T.*et al.* (1983), Micronucleet al circulating erythrocytes:a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, t. 11, s. 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, t. 189/2, s. 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, t. 14/3, s. 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, t. 245/4, s. 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, t. 278/2–3, s. 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, t. 10/3, s. 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, t. 23/4, s. 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, t. 453/1, s. 45–50.

(21) Hayes, J. *et al.* (2009), The rat bone marrow micronucleus test – study design and statistical power, Mutagenesis, t. 24/5, s. 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, t. 32/1, s. 84–100.

(23) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, wyd. II, John Wiley and Sons, Nowy Jork.

(24) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, t. 723/2, s. 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, t. 723/2, s. 108–120.

(26) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, t. 312/3, s. 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, t. 7/5, s. 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", Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 19, OECD Publishing, Paryż.

(29) LeBaron, M.J. *et al.* (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, t. 54/3, s. 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, tom 10/4, s. 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, t. 35/3, s. 234–252.

(32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, t. 390/1–2, s. 79–83.

(33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, t. 413/1, s. 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, t. 97/1, s. 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, t. 120/4, s. 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, t. 120/4, s. 269–275.

(37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, t. 213/1, s. 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, t. 439/1, s. 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, t. 5/4, s. 411–415.

(40) Miller, B.M. *et al.* (1991), Classification of micronucleet al murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, t. 6/4, s. 297–302.

(41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, t. 107/2, s. 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, t. 347/2, s. 97–99.

(43) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines", Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 198, OECD Publishing, Paryż.

▼**M7**

(44) Richold, M. *et al.* (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays", w: Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Sprawozdanie. Część I zmieniona, Kirkland, D.J. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 115–141.

(45) Lovell, D.P. *et al.* (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays", w: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 184–232.

(46) Hayashi, M. *et al.* (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, t. 102/suplement 1, s. 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, t. 469/2, s. 233–241.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICJE

Centromer: region(y) chromosomu, w którym(-ch) mikrotubule wrzeciona podziałowego są asocjowane w trakcie podziału komórki, co umożliwia przemieszczenie się chromosomów potomnych do biegunów komórek potomnych.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Erytroblast: wczesny etap rozwoju erytrocytu, bezpośrednio poprzedzający niedojrzały erytrocyt, na którym komórka nadal posiada jądro komórkowe.

Kinetochor: struktura białkowa tworząca się na centromerze komórek eukariotycznych, która łączy chromosom z polimerami mikrotubul z wrzeciona mitotycznego w trakcie mitozy i mejozy i która podczas podziału komórkowego rozdziela chromatydy siostrzane.

Mikrojądra: małe jądra, oddzielone oraz występujące dodatkowo w stosunku do jądra głównego komórek, wytwarzane w trakcie telofazy mitozy (mejozy) przez fragmenty chromosomów opóźnionych lub całe chromosomy.

Erytrocyt normochromatyczny lub dojrzały: w pełni dojrzały erytrocyt, który utracił pozostałość RNA pozostałą po enukleacji lub utracił inne krótkotrwałe markery komórki, które zwykle znikają po enukleacji w wyniku ostatecznego podziału erytroblastu.

Erytrocyt polichromatyczny lub niedojrzały: nowo powstały erytrocyt na pośrednim etapie rozwoju, barwiący się zarówno niebieskimi, jak i czerwonymi składnikami klasycznych barwników, takich jak barwnik Giemsy w metodzie Wrighta, ze względu na obecność pozostałości RNA w nowo powstałej komórce. Takie nowo powstałe komórki są niemal identyczne z retikulocytami, które wizualizuje się przy użyciu barwnika przyżyciowego, który powoduje zbijanie się pozostałości RNA w siateczkę. Do identyfikacji nowo powstałych czerwonych krwinek obecnie często wykorzystuje się inne metody, w tym monochromatyczne barwienie RNA za pomocą barwników fluorescencyjnych lub znakowanie krótkotrwałych markerów powierzchniowych takich jak CD71 przy użyciu przeciwciał fluorescencyjnych. Erytrocyty polichromatyczne, retikulocyty oraz erytrocyty CD71-pozytywne są erytrocytami niedojrzałymi, chociaż każda z tych grup ma nieco inny rozkład wieku.

Retikulocyt: nowo powstały erytrocyt barwiony barwnikiem przyżyciowym, który powoduje zbijanie się pozostałości RNA komórkowego w charakterystyczną siateczkę. Retikulocyty i erytrocyty polichromatyczne mają podobny rozkład wieku komórkowego.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M7

Dodatek 2

PLAN CZYNNIKOWY MAJĄCY NA CELU USTALENIE RÓŻNIC PŁCIOWYCH W TEŚCIE KOMETOWYM *IN VIVO*

Plan czynnikowy i jego analiza

W ramach takiego planu poddaje się badaniu co najmniej 5 samców i 5 samic przy każdym poziomie stężenia, co oznacza wykorzystanie co najmniej 40 zwierząt (20 samców i 20 samic oraz odpowiednie kontrole dodatnie).

Plan ten, będący jednym z prostszych planów czynnikowych, jest równoważny dwukierunkowej analizie wariancji, w której płeć i poziom stężenia stanowią efekty główne. Dane te można analizować, stosując wiele standardowych pakietów oprogramowania statystycznego, takich jak SPSS, SAS, STATA i Genstat, a także wykorzystując R.

W ramach analizy dokonuje się podziału zmienności w zbiorze danych na zmienność pomiędzy płciami, zmienność pomiędzy stężeniami oraz na zmienność zależną od interakcji pomiędzy płciami i stężeniami. Każdy z członów porównuje się z szacunkową zmiennością pomiędzy zwierzętami z kontrpróby w ramach grup zwierząt tej samej płci, którym podaje się substancję chemiczną w takim samym stężeniu. Szczegółowe informacje na temat metodyki przeprowadzania tego doświadczenia można znaleźć w wielu standardowych podręcznikach statystycznych (zob. bibliografia) oraz w narzędziach pomocowych dostarczanych razem z pakietami oprogramowania statystycznego.

Analizę rozpoczyna się od sprawdzenia członu interakcji płci ze stężeniem w tabeli ANOVA ([1]). W przypadku braku członu istotnej interakcji połączone wartości dla poszczególnych płci lub dla poszczególnych poziomów stężeń mogą posłużyć jako ważne testy statystyczne pomiędzy poziomami na podstawie członu zmienności wewnątrzgrupowej w tabeli ANOVA.

Kolejnym etapem analizy jest podział szacunku zmienności pomiędzy stężeniami na kontrasty do celów przeprowadzenia testu reakcji pod kątem kontrastów liniowych i kwadratowych przy poszczególnych poziomach stężeń. W przypadku wystąpienia istotnej interakcji pomiędzy płcią a stężeniem człon ten można również podzielić na kontrasty interakcji pomiędzy efektem liniowym a płcią oraz pomiędzy efektem kwadratowym a płcią. Człony te umożliwiają zbadanie, czy zależność stężenie-odpowiedź przebiega równolegle dla obydwu płci, czy też otrzymuje się różne odpowiedzi dla obu płci.

Szacunek zmienności wewnątrzgrupowej można wykorzystać do przeprowadzenia testów parami w odniesieniu do różnicy między średnimi. Tego rodzaju porównania można przeprowadzać pomiędzy średnimi dla obydwu płci oraz pomiędzy średnimi dla poszczególnych poziomów stężeń, np. w celu porównania z poziomami odnotowanymi w kontrolach ujemnych. W przypadkach, w których występuje istotna interakcja, można dokonać porównań pomiędzy średnimi dla poszczególnych stężeń w ramach danej płci lub pomiędzy średnimi dla poszczególnych płci w ramach danego stężenia.

Bibliografia

Istnieje wiele podręczników statystycznych poświęconych teorii, planowaniu, metodyce, analizie i interpretacji planów czynnikowych – począwszy od najprostszych analiz dwuczynnikowych po bardziej złożone formy wykorzystywane w metodyce planowania doświadczeń. Poniższa lista nie jest wyczerpująca. Niektóre publikacje zawierają praktyczne przykłady porównywalnych planów, niekiedy razem z kodem niezbędnym do przeprowadzenia analiz przy wykorzystaniu różnych pakietów oprogramowania.

([1]) Statystycy stosujący podejście modelowe, np. ogólne modele liniowe, mogą przeprowadzić analizę w inny, choć porównywalny, sposób, ale niekoniecznie muszą wyprowadzać tradycyjną tabelę ANOVA, która wywodzi się z algorytmicznych podejść do obliczania danych statystycznych opracowanych przed pojawieniem się komputerów.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. i Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. Nowy Jork: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. i Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. i 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 i Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.”;

▼B

B.13/14. **MUTAGENNOŚĆ – BADANIE MUTACJI POWROTNYCH W KOMORKACH BAKTERYJNYCH**

1. **METODA**

Metoda ta jest powtórzeniem OECD TG 471, badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych (1997).

1.1. WPROWADZENIE

Badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych wykorzystuje aminokwasy wymagające szczepów *Salmonella typhimurium* oraz *Escherichia coli* w celu wykrycia mutacji punktowych, które obejmują zastępowanie (substytucja), dodanie lub usunięcie jednego lub większej liczby par zasad DNA (1)(2)(3). Zasadą tego badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych jest to, że wykrywa ono mutacje, które powodują powrót mutacji obecnych w badanych szczepach oraz przywracają funkcjonalną zdolność bakterii do syntezowania podstawowego aminokwasu. Odpowiednie bakterie są wykrywane przez ich zdolność do wzrostu w razie nieobecności aminokwasu wymaganego przez macierzysty badany szczep.

Mutacje punktowe są przyczyną wielu chorób genetycznych u ludzi oraz istnieje podstawowy dowód na to, że mutacje punktowe w onkogenach i genach hamujących nowotwory komórek somatycznych są odpowiedzialne za nowotwory u ludzi oraz zwierząt badanych. Badanie mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych jest szybkie, tanie oraz względnie proste do przeprowadzenia. Wiele szczepów badanych posiada wiele cech, które czynią je bardziej czułymi na wykrywanie mutacji łącznie z reakcyjnymi sekwencjami DNA w lokalizacjach powrotnych, wzmożoną przenikalnością do dużych cząsteczek oraz eliminacją systemów naprawy DNA lub wzmocnieniem procesu naprawy DNA skłonnego do błędów. Specyficzność badanych szczepów może zapewnić pewne użyteczne informacje w sprawie typów mutacji, które są wywołane czynnikami genotoksycznymi. Bardzo duża baza danych wyników w odniesieniu do szerokiej różnorodności struktur jest dostępna w odniesieniu do badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych oraz dobrze ustalone metodologie zostały opracowane w odniesieniu do badanych substancji chemicznych o różnych właściwościach fizyczno-chemicznych łącznie ze związkami lotnymi.

Zob. również Ogólne wprowadzenie do części B.

1.2. DEFINICJE

Badanie mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych w *Salmonella typhimurium* albo *Escherichia coli* wykrywa mutacje w szczepie wymagającym aminokwasów (histydyny lub tryptofanu, odpowiednio) w celu wytworzenia szczepu niezależnie od zewnętrznych dostaw aminokwasów.

Pary zasad podstawiania mutagenów są czynnikami, które powodują zasadowe zmiany w DNA. W badaniu powrotnym ta zmiana może wystąpić w miejscu oryginalnej mutacji lub w drugim miejscu w genomie bakteryjnym.

Mutageny powodujące zmiany fazy odczytu są czynnikami, które powodują dodanie lub usunięcie jednej lub większej liczby par zasad w DNA, zmieniając w ten sposób odczyt RNA.

▼B

1.3. WSTĘPNE ROZWAŻANIA

Badanie mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych wykorzystuje komórki prokariotyczne, które różnią się od komórek ssaków takimi czynnikami jak pobór, przemiana materii, struktura chromosomowa procesy naprawy DNA. Badania przeprowadzane *in vitro* ogólnie wymagają wykorzystania egzogenicznego źródła aktywacji metabolicznej. Systemy aktywacji metabolicznej *in vitro* nie mogą naśladować całkowicie warunków *in vivo*. Badanie z tego względu nie dostarcza bezpośrednich informacji w sprawie potencjału mutagenności oraz rakotwórczości substancji u ssaków.

Badanie mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych jest powszechnie wykorzystywane jako wstępny przegląd aktywności genotoksycznej oraz, w szczególności w odniesieniu aktywacji wywołującej mutacje punktowe. Rozległa baza danych wykazała, że wiele substancji chemicznych, które są pozytywne w tym badaniu, ujawnia również aktywność mutagenną w innych badaniach. Istnieją przykłady czynników mutagennych, które nie są wykryte przez to badanie, powody tych niedoborów mogą zostać przypisane szczególnemu charakterowi wykrytego punktu końcowego, różnicom między aktywacją metaboliczną lub różnicom w biodostępności. Z drugiej strony, czynniki, które wzmacniają wrażliwość badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych, mogą prowadzić do zbyt wysokiego oszacowania aktywność mutagennej.

Badanie mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych może być nieodpowiednie w odniesieniu do oceny niektórych klas substancji chemicznych, na przykład wysoce bakteriobójczych związków (np. niektóre antybiotyki) oraz tych, które uznaje się za (które znane są) zakłócające szczególnie system replikacji komórek ssaków (np. niektóre czynniki hamujące topoizomerazę oraz niektóre nuklozydowe substancje analogiczne). W takich przypadkach badanie mutacji u ssaków może być bardziej odpowiednie.

Chociaż wiele związków, które są pozytywne w tym badaniu, jest czynnikami rakotwórczymi dla ssaków, korelacja nie jest zupełna. Zależy to od klasy substancji chemicznej oraz istnieją czynniki rakotwórcze, które nie są wykrywane przez substancje badaną, ponieważ działają one przez inne niegenotoksyczne mechanizmy lub mechanizmy nieobecne w komórkach bakteryjnych.

1.4. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Zawiesiny komórek bakteryjnych są poddane działaniu substancji badanej, w obecności oraz w nieobecności egzogenicznego systemu aktywacji metabolicznej. W metodzie włączania płytki te zawiesiny są zmieszane z nałożonym agarem oraz nakładane na minimalne podłoże. W odniesieniu do obu technik, po dwóch lub trzech dniach inkubacji, powrotne hodowle są podliczane oraz porównywane z ilością spontanicznie powracających hodowli na rozpuszczalnikowych płytkach kontrolnych.

Zostało opisanych wiele procedur w odniesieniu do przeprowadzania badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych. Wśród tych powszechnie wykorzystywanych znajdują się metoda włączająca płytkę (1)(2)(3)(4), metoda uprzedniej inkubacji (2)(3)(5)(6)(7)(8), metoda fluktuacji (9)(10) oraz metoda zawiesinowa (11). Zostały opisane modyfikacje w odniesieniu do badania gazów lub oparów (12).

▼B

Procedury opisane w tej metodzie odnoszą się przede wszystkim do metod włączenia płytki oraz uprzedniej inkubacji. Żadna z nich nie jest dopuszczalna w odniesieniu do przeprowadzania doświadczeń zarówno z aktywacją metaboliczną, jak i bez niej. Niektóre substancje mogą zostać wykryte w bardziej skuteczny sposób, wykorzystując metodę uprzedniej inkubacji. Substancje te należą do klas chemicznych, które obejmują nitrozaminy o krótkich łańcuchach, metale dwuwartościowe, aldehydy, barwniki azowe oraz związki diazowe oraz alkaloidy pirolizydynowe, związki allilowe oraz związki azotowe (3). Rozpoznano także, że niektóre klasy mutagenów nie są zawsze wykrywane, wykorzystując procedury standardowe, takie jak metoda włączająca płytki lub metoda uprzedniej inkubacji. Powinny być one uznawane za „szczególne przypadki" i silnie zalecane jest, iż powinny zostać wykorzystane alternatywne procedury. Następujące „szczególne przypadki" mogą zostać zidentyfikowane (wraz z przykładami procedur, które mogłyby zostać wykorzystane w odniesieniu do ich wykrycia) barwniki azowe oraz związki diazowe (3)(5)(6)(13), gazy oraz lotne substancje chemiczne (12)(14)(15)(16) oraz glikozydy (17)(18). Odchylenie od standardowej procedury musi zostać naukowo uzasadnione.

1.5. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.5.1. **Preparaty**

1.5.1.1. *Bakterie*

Świeże kultury bakterii powinny być hodowane do późnej fazy wykładniczej lub wczesnej fazy stacjonarnej wzrostu (w przybliżeniu 10^9 komórek na ml). Kultury bakteryjne w późnej fazie stacjonarnej nie powinny być wykorzystywane. Zasadnicze jest, aby kultury bakteryjne wykorzystywane w badaniu zawierały wysokie miano bakterii zdolnych do życia. Miano może być wykazane zarówno z historycznych danych dotyczących kontroli krzywych wzrostu, w każdym oznaczaniu przez określenie ilości zdolnych do życia komórek przez doświadczenie platerowania.

Zalecaną temperaturą inkubacji jest 37 °C.

Powinno zostać wykorzystane przynajmniej pięć szczepów bakterii. Powinno to obejmować cztery szczepy *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 lub TA97a lub TA97; TA98; oraz TA100), które zostały pokazane jako mające być rzetelne oraz odtwarzalnie reagujące między laboratoriami. Te cztery szczepy *S. typhimurium* posiadają GC pary bazowe w miejscu podstawowego powrotu oraz wiadome jest, że nie mogą one wykrywać utleniających mutagenów, czynników sieciujących oraz hydrazyny. Takie substancje mogą być wykrywane przez szczepy *E. coli* WP2 lub *S. typhimurium* TA1 02 (19), które posiadają pary zasad AT w miejscu podstawowego powrotu. Z tego względu zalecaną kombinacją szczepów jest:

— *S. typhimurium* TA1 535, oraz

— *S. typhimurium* TA1 537 lub TA97, lub TA97a, oraz

— *S. typhimurium* TA98, oraz

— *S. typhimurium* TA100, oraz

— *E. coli* WP2 uvrA lub *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), lub *S. typhimurium* TA102.

W celu wykrycia mutagenów sieciujących preferowane może być objęcie TA102 lub dodanie wprawnych w naprawianie DNA szczepów *E. coli* (np. *E. coli* WP2 lub *E. coli* WP2 (pKM101)).

▼B

Powinny być wykorzystywane ustalone procedury przygotowania hodowli podstawowych, weryfikacja markerem oraz składowanie. Wymogi w odniesieniu do wzrostu, dotyczące aminokwasu, powinny być wykazane dla każdego zamrożonego preparatu hodowli podstawowych (histydyna dla szczepów *S. typhimurium* oraz tryptofan dla szczepów *E. coli*). Inne właściwości fenotypowe powinny zostać sprawdzone w podobny sposób, mianowicie: obecność lub nieobecność plazmidów czynnika R, gdzie stosowne (np. odporność na ampicylinę w szczepach TA98, TA100 oraz TA97a lub TA97, WP2 uvrA oraz WP2 uvrA (pKM101), oraz odporność na ampicylinę + tetracyklinę w szczepie TA 102); (np. rfa mutacja w *S. typhimurium* przez wrażliwość na fiolet krystaliczny oraz uvrA mutacja w *E. coli* lub uvrB mutacja w *S. typhimurium* przez wrażliwość na światło ultrafioletowe) (2)(3). Szczepy powinny również wytwarzać spontaniczne kolonie powrotne w ramach zakresów częstotliwości oczekiwanych na podstawie historycznych danych laboratoryjnych oraz przeważnie w zakresie odnotowanym w literaturze.

1.5.1.2. *Podłoże*

Wykorzystywany jest odpowiedni minimalny agar (np. zawierające Vogel-Bonner minimalne podłoże E oraz glukoza) oraz powlekający agar zawierający histydynę oraz biotynę lub tryptofan w celu umożliwienia podziału kilku komórek (1)(2)(9).

1.5.1.3. *Aktywacja metaboliczna*

Bakterie powinny być poddane działaniu substancji badanej zarówno w obecności, jak i w nieobecności odpowiedniego systemu aktywacji metabolicznej. Najbardziej powszechnie wykorzystywanym systemem jest uzupełniana współczynnikiem frakcja pomitochondrialna (S9) przygotowana z wątroby gryzoni poddanych działaniu czynników pobudzających enzymy takimi jak Aroklor 1254 (1)(2) lub kombinacją feno-barbitonu oraz B nafoflavonu (18)(20)(21). Frakcja pomitochondrialna jest zazwyczaj wykorzystywana w stężeniach w zakresie od 5 do 30 % objętościowo w mieszaninie S9. Wybór oraz warunki systemu metabolicznej aktywacji mogą być uzależnione od klasy badanej substancji chemicznej. W niektórych przypadkach właściwe może być wykorzystanie więcej niż jednego stężenia frakcji pomitochondrialnej. W odniesieniu do barwników azowych oraz związków diazowych, przy wykorzystaniu systemu aktywacji metabolicznej, może być bardziej odpowiednie (6)(13).

1.5.1.4. *Substancja testowa/preparat*

Stała substancja badana powinna zostać rozpuszczona lub zawieszona w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczona, jeżeli jest to odpowiednie przed poddaniem bakterii działaniu substancji. Płynne substancje badane mogą być dodawane bezpośrednio do systemu badawczego i/lub rozcieńczane przed poddaniem działaniu substancji. Powinny zostać wykorzystane świeże preparaty, chyba że dane dotyczące stabilności wykazują dopuszczalność składowania.

Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien mieć możliwości reagowania chemicznego z substancją badaną oraz powinien być zgodny z przeżywaniem bakterii oraz aktywnością S9. Jeśli inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki są wykorzystywane, ich włączenie do doświadczenia powinno być wsparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników. Badając substancje niestabilne w wodzie, wykorzystane rozpuszczalniki organiczne powinny być wolne od wody.

▼B

1.5.2. **Warunki badawcze**

1.5.2.1. *Szczepy badane (zob. ppkt 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Stężenie poddania działaniu substancji*

Wśród kryteriów, które mają być uwzględnione, oznaczając najwyższą ilość substancji badanej, które ma zostać wykorzystana, jest cytotoksyczność oraz rozpuszczalność w końcowej mieszaninie, której działaniu poddawane są szczepy.

Użyteczne może być oznaczenie toksyczności oraz nierozpuszczalności w doświadczeniu wstępnym. Cytotoksyczność może zostać wykryta przez redukcję ilości powrotnych hodowli, oczyszczenie lub zmniejszenie podłoża lub stopień przeżywania poddanych działaniu substancji hodowli. Cytotoksyczność substancji może być zmieniana w obecności systemów aktywacji metabolicznej. Nierozpuszczalność powinna zostać oceniona jako wytrącanie w końcowej mieszaninie w rzeczywistych warunkach badania oraz oczywistych dla oka nieuzbrojonego.

Zalecane najwyższe stężenie badawcze w odniesieniu do rozpuszczalnych niecytotoksycznych substancji stanowi 5 mg/płytkę lub 5 µl/płytkę. W odniesieniu do niecytotoksycznych substancji, które nie są rozpuszczalne przy 5 mg/płytkę lub 5 µl/płytkę, jedno lub więcej badanych stężeń powinno być nierozpuszczalne w końcowej mieszaninie cytotoksycznej. Strącanie nie powinno zakłócać oceny.

Przynajmniej pięć różnych nadających się do analizowania stężeń substancji badanej powinno zostać wykorzystane przy w przybliżeniu połowie logarytmu (np. √1 0) odstępów czasu między punktami badawczymi w odniesieniu do wstępnego doświadczenia. Krótsze odstępy czasu mogą być odpowiednie, jeśli reakcja stężenia jest badana. Badanie powyżej stężenia 5 mg/płytkę lub 5 µl/płytkę może być brane pod uwagę, oceniając substancje zawierające podstawowe ilości potencjalnie mutagennych zanieczyszczeń.

1.5.2.3. *Negatywne i pozytywne kontrole*

Równoległe, specyficzne co do szczepu pozytywne i negatywne (rozpuszczalnik lub nośnik) kontrole, zarówno z aktywacją metaboliczną, jak i bez niej, powinny być włączone w ramy każdego oznaczania. Powinien zostać przeprowadzony wybór uwzględniania pozytywnych kontroli, które wykazują skuteczne działanie każdego oznaczania.

W odniesieniu do oznaczeń wykorzystujących system metabolicznej aktywacji, substancja(-e) wzorcowa(-e) kontroli pozytywnych powinna(-y) zostać wybrana(-e) na podstawie typu wykorzystanego szczepu bakterii.

Następujące substancje stanowią przykłady odpowiednich substancji pozytywnych kontroli w odniesieniu do oznaczania z metaboliczna aktywacją:

Substancja	Nr CAS	Nr Einecs
9,10-dimetyloantracen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetylobenzo[a]antracen	57-97-6	200-359-5
Benzo[a]piren	50-32-8	200-028-5
2-aminoantracen	613-13-8	210-330-9

▼B

Substancja	Nr CAS	Nr Einecs
Cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
Cyklofosfamid monohydrat	6055-19-2	

Następująca substancja jest odpowiednią kontrolą pozytywną w odniesieniu do metody redukcyjnej aktywacji metabolicznej:

Substancja	Nr CAS	Nr Einecs
Congo Red	573-58-0	209-358-4

2-aminoantracen nie powinien być wykorzystywany jako wyłączny wskaźnik skuteczności mieszaniny S9. Jeśli wykorzystywany jest 2-aminoantracen, każda partia S9 powinna być również charakteryzowana mutagenem, który wymaga metabolicznej aktywacji przez enzymy mikrosomowe, np. benzo[a]piren, dimetylobenzoantracen.

Następujące substancje są przykładami specyficznych co do szczepu kontroli pozytywnych dla badań przeprowadzanych bez egzogenicznego systemu aktywacji metabolicznej:

Substancje	Nr CAS	Einecs No	Szczep
Azydek sodu	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 i TA 100
2-nitrofluoren	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoakrydyna	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 i TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 i TA 97a
Hydronadtlenek kumenu	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomycyna C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA i TA 102
N-etylo-N-nitro-N-nitrozoguanidyna	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA i WP2uvrA (pKM101)
1-tlenek 4-nitrokwinolinu	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA i WP2uvrA (pKM101)
Furylofuramid (AF2)		3688-53-7	Szczepy zawierające plazmidy

Mogą być wykorzystane inne odpowiednie substancje kontroli pozytywnych. Wykorzystanie substancji powiązanych klasą z substancjami kontroli pozytywnych powinno zostać uwzględnione, jeżeli są one dostępne.

Negatywne kontrole, składające się z samego rozpuszczalnika lub nośnika bez substancji badanej, oraz w innych przypadkach poddane działaniu w ten sam sposób jak grupy poddane działaniu substancji powinny zostać objęte kontrolą. Dodatkowo kontrole bez poddania działaniu substancji powinny być również wykorzystywane, chyba że istnieją historyczne dane dotyczące kontroli wykazujące, że brak szkodliwych lub mutagennych skutków wywoływanych wybranym rozpuszczalnikiem.

▼B

1.5.3. **Procedura**

W odniesieniu do metody włączającej płytkę (1)(2)(3)(4), bez aktywacji metabolicznej, zazwyczaj 0,05 ml lub 0,1 ml stężenia badawczego, 0,1 ml świeżej hodowli bakteryjnej (zawierającej w przybliżeniu 108 zdolnych do życia komórek) oraz 0,5 ml sterylnego bufora jest mieszane z 2,0 ml pokrywającego agaru. W odniesieniu do oznaczania z aktywacją metaboliczną zazwyczaj 0,5 ml mieszaniny aktywacji metabolicznej zawierającej odpowiednie ilości pomitochondrialnej frakcji (w zakresie 5–30 % objętościowo w mieszaninie aktywacji metabolicznej) są mieszane z pokrywającym agarem (2,0 ml), łącznie z roztworem substancji badanej. Zawartości każdej z rurek są mieszane oraz wylewane na powierzchnię minimalnej płytki agarowej. Agar pokrywający krzepnie przed inkubacją.

W odniesieniu do metody uprzedniej inkubacji (2)(3)(5)(6) substancja badana/roztwór badany jest uprzednio inkubowany ze szczepem badanym (zawierającym w przybliżeniu 108 zdolnych do życia komórek) oraz sterylnym roztworem buforowym lub systemem metabolicznej aktywacji (0,5 ml) zazwyczaj przez 20 minut lub dłużej w temperaturze 30–37 °C przed mieszaniem z pokrywającym agarem oraz polewając na powierzchnię minimalnej płytki agarowej. Zazwyczaj 0,05 lub 0,1 ml substancji badanej/roztworu badanego, 0,1 ml i bakterii oraz 0,5 ml mieszaniny S9 lub sterylnego roztworu buforowego są mieszane z 2,0 ml pokrywającego agaru. Rurki powinny zostać napowietrzone w trakcie uprzedniej inkubacji, wykorzystując wstrząsarkę.

W odniesieniu do odpowiedniego szacowania zmienności trzykrotne pokrywanie płytkami powinno zostać wykorzystane przy każdej dawce badanej. Wykorzystanie podwójnego pokrywania płytkami jest dopuszczalne, jeżeli jest to naukowo uzasadnione. Okazjonalna strata płytki niekoniecznie czyni oznaczanie nieważnym.

Gazowe lub lotne substancje powinny być badane odpowiednimi metodami, takimi jak np. w szczelnie zamkniętych naczyniach (12)(14)(15)(16).

1.5.4. **Inkubacja**

Wszystkie płytki w danym oznaczeniu powinny być inkubowane w temperaturze 37 °C przez 48–72 godzin. Po okresie inkubacji podliczana jest liczba powrotnych kolonii.

2. **DANE**

2.1. PRZETWARZANIE WYNIKÓW

Dane powinny zostać przedstawione jako liczba kolonii przypadająca na płytkę. Liczba powrotnych kolonii zarówno w płytkach negatywnych (kontrola rozpuszczalnikowa oraz kontrola bez poddania działaniu substancji, jeżeli zostały wykorzystane), jak i pozytywnych kontroli powinny zostać również podane. Podlicza się poszczególne płytki, średnia liczba powrotnych kolonii przypadająca na płytkę powinna zostać przedstawiona w odniesieniu do substancji badanej oraz pozytywnej i negatywnej (bez poddania działaniu substancji badanej i/lub rozpuszczalnikowej) kontroli.

Nie istnieje wymóg jasnej reakcji pozytywnej w odniesieniu do weryfikacji. Niejednoznaczne wyniki powinny zostać wyjaśnione w drodze dalszych badań, w szczególności z wykorzystaniem modyfikacji warunków doświadczalnych. Wyniki negatywne muszą zostać potwierdzone na zasadzie jednostkowych przypadków. Modyfikacja parametrów badawczych w celu poszerzenia zakresu ocenionych warunków powinna zostać rozważona w dalszych doświadczeniach. Parametry badawcze, które mogą być zmodyfikowane, obejmują zakres stężenia, metodę poddania działaniu substancji badanej (włączenie płytek lub uprzednia inkubacja) oraz warunki aktywacji metabolicznej.

▼B

2.2. OCENA ORAZ INTERPRETACJA WYNIKÓW

Istnieją liczne kryteria oznaczania wyników pozytywnych, takie jak związany z dawką wzrost ilości powrotnych kolonii powyżej zakres badanych i/lub odtwarzalności przy jednym lub większej ilości stężeń, przypadających na płytkę w przynajmniej jednym szczepie z lub bez systemu aktywacji metabolicznej. Biologiczne znaczenie wyników powinno zostać wzięte pod uwagę w pierwszej kolejności. Metody statystyczne mogą zostać wykorzystane jako metody pomocnicze w przeprowadzaniu oceny wyników (24). Jednakże znaczenie statystyczne nie powinno być jedynym czynnikiem określającym w odniesieniu do reakcji pozytywnej.

Substancja badana, w odniesieniu do której wyniki nie spełniają powyższych kryteriów, uważana jest za niemutagenną w tym badaniu.

Chociaż większość doświadczeń będzie dawało w jasny sposób pozytywne lub negatywne wyniki, w rzadkich przypadkach zestaw danych będzie wykluczał dokonanie ostatecznej oceny dotyczącej aktywności badanej substancji. Wyniki mogą pozostać niejednoznaczne lub sporne niezależnie od liczby powtórzonych doświadczeń.

Wyniki pozytywne z badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych wskazują, że substancja badana wywołuje mutacje punktowe przez zastąpienie lub mutacje fazy odczytu w genomie albo *Salmonella typhimurium* i/lub *Escherichia coli*. Wyniki negatywne wskazują, że w warunkach badawczych substancja badana nie jest mutagenna w badanym gatunku.

3. **SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Rozpuszczalnik/nośnik:

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika,

— rozpuszczalność oraz stabilność substancji w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli jest znana.

Szczepy:

— wykorzystane szczepy,

— liczba komórek przypadająca na kulturę,

— właściwości szczepu.

Warunki badania:

— ilość substancji badanej przypadająca na płytkę (mg/płytkę lub µl/płytkę) wraz z racjonalnym uzasadnieniem wyboru dawki i liczby płytek przypadającej na stężenie,

— wykorzystane podłoże,

— rodzaj oraz skład systemu aktywacji metabolicznej, w tym dopuszczalność kryteriów,

— procedura poddania działaniu substancji badanej,

Wyniki:

— oznaki toksyczności,

— oznaki wytrącania,

— liczba poszczególnych płytek,

▼B

— średnia liczba powrotnych kolonii przypadających na kolonię oraz standardowe odchylenie,

— relacja miedzy dawką a reakcją, w miarę możliwości,

— analizy statystyczne, jeżeli istnieją,

— dane dotyczące równoległych oraz kontroli negatywnych i pozytywnych (rozpuszczalnik/nośnik), wraz z zakresami, średnimi oraz standardowymi odchyleniami,

— dane dotyczące historycznych kontroli negatywnych i pozytywnych, rozpuszczalnik/nośnik), wraz z zakresami, średnimi oraz standardowymi odchyleniami.

Omówienie wyników.

Wnioski.

4. **ODNIESIENIA**

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 31, pp. 347–364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 113, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 91–96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, w: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens,* ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273–285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Muta tion Assays, w: *Basic Mutagenicity TestS: UKEMS Part 1 Revised, ed. D.J. Kirkland,* Cambridge University Press, pp. 13–61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, J. *Food Safety,* 8, pp. 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, pp. 33–42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, w: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures,* 2nd Edition, ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 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, pp. 453–465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.,* 307, pp. 335–344.

(13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.,* 136, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 421–441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (19 79), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium, Cancer Res.,* 39, pp. 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, pp. 4961–4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimu rium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis,* 5, pp. 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, w: *In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing,* eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 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-inducedS9 *ininvitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis, 7,* pp. 175–177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.,* 88, pp. 343–350.

(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, pp. 83–91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, w: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28–65.

▼M7

———————

———————

▼M8

B.17. TESTY MUTACJI GENOWYCH NA KOMÓRKACH SSAKÓW *IN VITRO* Z WYKORZYSTANIEM GENÓW HPRT I XPRT

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 476 (2016). Metody badawcze są poddawane okresowemu przeglądowi w związku z postępem naukowym, zmieniającymi się potrzebami regulacyjnymi oraz troską o dobrostan zwierząt. Niniejsza zaktualizowana wersja metody badawczej B.17 odzwierciedla prawie trzydzieści lat doświadczenia w stosowaniu metody badawczej, a także stanowi efekt opracowania oddzielnej nowej metody przeznaczonej do testów mutacji genowych na komórkach ssaków *in vitro* z wykorzystaniem genu kinazy tymidynowej. Metoda badawcza B.17 stanowi część serii metod dotyczących toksykologii genetycznej. OECD opracowała dokument, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd najnowszych zmian, jakie wprowadzono do wytycznych OECD dotyczących badań w zakresie toksykologii genetycznej (1).

2. Celem testu mutacji genowych na komórkach ssaków *in vitro* jest wykrycie mutacji genowych wywołanych przez substancje chemiczne. Linie komórkowe stosowane w tych badaniach mierzą mutacje pierwotne w genach reporterowych, w szczególności w endogennym genie fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (Hprt w komórkach gryzoni, HPRT w komórkach ludzkich; w niniejszej metodzie badawczej zbiorczo zwane genem Hprt i badaniem HPRT) i transgenu fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (GPT) (zwanego badaniem XPRT). Badania mutacji HPRT oraz XPRT wykrywają różne widma zdarzeń genetycznych. Poza zdarzeniami mutacji wykrywanymi przy pomocy badania HPRT (np. mutacjami punktowymi, zmianami fazy odczytu, niewielkimi delecjami i insercjami) lokalizacja w autosomie transgenu GPT może pozwolić na wykrycie mutacji powodowanych dużymi delecjami i możliwe, że również rekombinacji mitotycznej niewykrytej w badaniu HPRT z powodu umiejscowienia genu Hprt na chromosomie X (2)(3)(4)(5)(6)(7). Metoda badania XPRT jest obecnie stosowana do celów regulacyjnych w mniejszym zakresie niż badanie HPRT.

3. Zastosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

4. Badania przeprowadzane *in vitro* wymagają zazwyczaj wykorzystania egzogennego źródła aktywacji metabolicznej. Egzogenny układ metabolizujący nie jest w stanie całkowicie naśladować warunków *in vivo*.

5. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć wystąpienia warunków, które mogłyby prowadzić do zniekształconych wyników dodatnich (tj. do potencjalnej interakcji z układem badawczym) niespowodowanych bezpośrednią interakcją między badanymi substancjami chemicznymi a materiałem genetycznym komórki; do takich warunków zalicza się zmiany pH lub osmolalności (8)(9)(10), interakcje z elementami podłoża (11)(12) bądź zbyt wysokie poziomy cytotoksyczności (13). Cytotoksyczność przekraczającą zalecane najwyższe poziomy cytotoksyczności ustanowione w pkt 19 uznaje się za zbyt wysoką w przypadku badania HPRT.

▼M8

6. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli istnieje wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

ZASADA BADANIA

7. Zmutowane komórki charakteryzujące się niedoborem aktywności enzymów HPRT w badaniu HPRT lub niedoborem aktywności enzymów XPRT w badaniu XPRT są odporne na działanie cytostatyczne 6-tioguaniny (TG) będącej analogiem puryny. Komórki, w przypadku których odnotowuje się prawidłowy poziom enzymów HPRT (w ramach badania HPRT) lub enzymów GPT (w ramach badania XPRT), są wrażliwe na TG, która powoduje wstrzymanie komórkowej przemiany materii oraz zatrzymuje dalsze dzielenie się komórek. W ten sposób zmutowane komórki są w stanie rozmnażać się w obecności TG, natomiast normalne komórki, które zawierają enzymy HPRT (w przypadku badania HPRT) lub GPT (w przypadku badania XPRT), nie mogą.

8. Komórki w zawiesinie lub w jednowarstwowych hodowlach są poddawane działaniu badanej substancji chemicznej, zarówno z udziałem jak i bez udziału egzogennego źródła aktywacji metabolicznej (zob. pkt 14), przez odpowiedni okres (3–6 godzin), a następnie hodowane wtórnie w celu oznaczenia cytotoksyczności oraz dopuszczenia do ekspresji fenotypowej przed wybraniem mutanta (14)(15)(16)(17). Cytotoksyczność jest oznaczana na podstawie względnego wskaźnika przeżyć, tj. skuteczności klonowania mierzonej natychmiast po zakończeniu poddawania działaniu substancji i skorygowanej o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji badanej w stosunku do kontroli ujemnej (pkt 18 dodatku 2). Kultury poddane działaniu substancji są utrzymywane na podłożu przez okres odpowiedni dla każdego wybranego rodzaju komórki, aby umożliwić zbliżoną do optymalnej ekspresję fenotypową wywołanych mutacji (zazwyczaj co najmniej 7–9 dni). Po uzyskaniu ekspresji fenotypowej oznacza się częstość występowania mutacji, dokonując posiewu określonej liczby komórek na podłożu zawierającym czynnik selektywny w celu wykrycia kolonii zmutowanych komórek oraz na podłożu pozbawionym takiego czynnika selektywnego, aby oznaczyć skuteczność klonowania (żywotność). Kolonie liczy się po upływie odpowiedniego okresu inkubacji. Częstość występowania mutacji oblicza się na podstawie liczby kolonii zmutowanych komórek skorygowanej o wartość wskaźnika skuteczności klonowania w momencie wyboru zmutowanych komórek.

OPIS METODY

Czynności przygotowawcze

Komórki

9. Rodzaje komórek wykorzystywane w badaniach HPRT i XPRT powinny charakteryzować się wykazaną wrażliwością na oddziaływanie mutagenów, wysoką skutecznością klonowania, stabilnym kariotypem oraz stabilną spontaniczną częstością występowania mutacji. Wśród rodzajów komórek powszechnie wykorzystywanych w badaniach HPRT należy wymienić linie komórkowe CHO, CHL i V79 chomika chińskiego, mysie komórki chłoniaków L5178Y oraz ludzkie komórki limfoblastyczne TK6 (18)(19). W badaniu XPRT wykorzystuje się komórki AS52 pochodzące z linii CHO i zawierające transgen GPT, z których usunięto gen HPRT (20)(21); komórki AS52 nie mogą zostać poddane badaniu HPRT, ponieważ usunięty został gen HPRT. Korzystanie z innych linii komórkowych powinno zostać uzasadnione i zatwierdzone.

10. Linie komórkowe powinny być rutynowo sprawdzane pod kątem stabilności zmiennej liczby chromosomów oraz braku zanieczyszczenia mykoplazmą (22)(23), a komórki nie powinny być wykorzystywane, jeżeli są zanieczyszczone lub doszło do zmiany zmiennej liczby chromosomów. Należy ustalić normalny czas trwania cyklu komórkowego wykorzystywanego w laboratorium badawczym, który powinien być zgodny z opublikowanymi właściwościami komórek. Należy również sprawdzić spontaniczną częstość wystę-

▼M8

powania
mutacji w banku komórek macierzystych – w przypadku stwierdzenia, że wskaźnik częstości występowania mutacji w danej kulturze jest niedopuszczalny, taka kultura nie powinna być wykorzystywana.

11. Przed wykorzystaniem kultur do celów tego badania konieczne może okazać się ich oczyszczenie z powstałych wcześniej zmutowanych komórek, np. poprzez hodowanie komórek na podłożu HAT w przypadku badania HPRT oraz na podłożu MPA w przypadku badania XPRT (5)(24) (zob. dodatek 1). Oczyszczone komórki mogą zostać poddane krioprezerwacji, a następnie rozmrożone w celu ich wykorzystania w charakterze kultur roboczych. Nowo rozmrożona kultura robocza może zostać wykorzystana do celów badania po osiągnięciu standardowych czasów podwojenia. Przy przeprowadzaniu badania XPRT rutynowa kultura komórek AS52 powinna być utrzymywana w warunkach gwarantujących zachowanie transgenu GPT (20).

Podłoża i warunki hodowli kultur

12. W celu utrzymania kultur należy zastosować odpowiednie podłoże oraz warunki inkubacji (naczynia do hodowli komórkowych, wilgotne środowisko o zawartości CO_2 wynoszącej 5 %, oraz temperatura inkubacji 37 °C). Kultury komórkowe powinny być zawsze utrzymywane w warunkach zapewniających fazę logarytmicznego wzrostu. W tym kontekście szczególne znaczenie ma dobór podłoża i warunków hodowli kultur w taki sposób, aby zapewnić optymalny wzrost komórek w okresie ekspresji oraz optymalną skuteczność klonowania zarówno w przypadku komórek zmutowanych, jak i komórek niezmutowanych.

Przygotowanie kultur

13. Linie komórkowe są rozmnażane z kultur wyjściowych i wysiewane na podłoże z taką gęstością, by komórki w zawiesinach lub jednowarstwowych hodowlach mogły nadal rosnąć wykładniczo przez okres poddawania działaniu substancji i okres ekspresji (np. należy unikać konfluencji w przypadku komórek rosnących w jednowarstwowych hodowlach).

Aktywacja metaboliczna

14. Egzogenne układy metabolizujące powinny być stosowane w przypadku wykorzystania komórek o nieodpowiedniej endogennej wydolności metabolicznej. Najpowszechniej stosowanym układem, który jest domyślnie zalecany, jeżeli w danym przypadku nie występują czynniki uzasadniające zastosowanie innego układu, jest frakcja postmitochondrialna suplementowanego kofaktora (S9) przygotowywana z wątrób gryzoni (najczęściej szczurów) poddawanych działaniu substancji indukujących enzymy takich jak Aroclor 1254 (25)(26)(27)(28) lub połączenie fenobarbitalu i β-naftoflawonu (29)(30)(31)(32). Stosowanie tego ostatniego połączenia substancji nie narusza postanowień Konwencji sztokholmskiej w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych (33), przy czym połączenie to okazało się równie skuteczne jak Aroclor 1254 w indukowaniu oksydaz wieloczynnościowych (29)(31). Frakcja S9 jest zazwyczaj wykorzystywana w stężeniach mieszczących się w przedziale 1–2 % (objętościowo), ale stężenie to może zostać zwiększone do 10 % (objętościowo) w końcowym podłożu badawczym. Klasa badanych substancji może wywierać wpływ na rodzaj i stężenie stosowanego egzogennego układu metabolizującego lub czynnika pobudzającego metabolizm (34)(35)(36).

Przygotowanie badanej substancji chemicznej

15. Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuścić w odpowiednich rozpuszczalnikach oraz – w stosownych przypadkach – rozcieńczyć przed poddaniem komórek ich działaniu (zob. pkt 16). Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym można dodać do układu badawczego bezpośrednio lub rozcieńczyć je przed poddaniem układu badawczego ich działaniu. Badane substancje chemiczne w stanie gazowym lub lotnym należy badać, wprowadzając stosowne modyfikacje w standardowych protokołach, np. poddając układ działaniu substancji w szczelnie zamkniętych naczyniach do hodowli komórkowych (37)(38). Preparaty badanej substancji chemicznej należy przygotowywać tuż przed poddaniem komórek jej działaniu, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, że dopuszczalne jest składowanie substancji.

▼M8

WARUNKI BADANIA

Rozpuszczalniki

16. Rozpuszczalnik należy wybrać tak, aby zoptymalizować rozpuszczalność badanych substancji chemicznych, unikając niepożądanego wpływu na przebieg badania, np. zmiany wzrostu komórek, wpływu na integralność badanej substancji chemicznej, reakcji z naczyniami do hodowli komórkowych czy zakłócenia układu metabolizującego. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć możliwość zastosowania wodnego rozpuszczalnika (lub podłoża). Sprawdzonymi rozpuszczalnikami są na przykład woda i sulfotlenek dimetylu. Zasadniczo zawartość rozpuszczalników organicznych nie powinna przekraczać 1 % (obj.) a zawartość rozpuszczalników wodnych (soli fizjologicznej lub wody) w końcowym podłożu użytym do badania nie powinna przekroczyć 10 % (obj.). Jeżeli używane są niesprawdzone rozpuszczalniki (np. etanol czy aceton), ich użycie powinno być uzasadnione danymi, które potwierdzają ich zgodność z badanymi substancjami chemicznymi oraz z układem badawczym, a także brak właściwości świadczących o toksyczności genetycznej w zastosowanym stężeniu. W przypadku braku takich danych potwierdzających, należy uwzględnić dodatkowe kontrole niepoddane działaniu substancji (zob. dodatek 1), aby wykazać, że wybrany rozpuszczalnik nie wywołuje szkodliwych ani mutagennych skutków.

Pomiar cytotoksyczności i wybór stężeń ekspozycyjnych

17. Przy ustalaniu najwyższego stężenia badanej substancji chemicznej należy unikać stężeń, które mogą doprowadzić do zniekształconych wyników dodatnich, np. stężeń wywołujących nadmierną cytotoksyczność (zob. pkt 20), wytrącania substancji w podłożu (zob. pkt 21) lub znacznej zmiany w pH lub osmolalności (zob. pkt 5). Jeżeli badana substancja chemiczna wywołuje znaczną zmianę pH podłoża w momencie jej dodania, poziom pH można skorygować, buforując końcowe podłoże użyte do badania, aby uniknąć zniekształconych wyników dodatnich i utrzymać odpowiednie warunki hodowli kultur.

18. Wyboru stężenia dokonuje się na podstawie poziomu cytotoksyczności oraz innych parametrów (zob. pkt 20–22). Choć dokonanie oceny cytotoksyczności na etapie badania wstępnego może przyczynić się do precyzyjniejszego określenia stężeń, które mają zostać zastosowane w ramach głównego doświadczenia, wykonanie takiego badania wstępnego nie jest wymagane. Nawet w przypadku dokonania wstępnej oceny cytotoksyczności, w ramach głównego doświadczenia należy wykonać ponownie pomiar cytotoksyczności w odniesieniu do każdej kultury. Ocenę cytotoksyczności należy przeprowadzić w oparciu o względny wskaźnik przeżyć, tj. wskaźnik skuteczności klonowania komórek posianych natychmiast po poddaniu działaniu substancji skorygowany o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji na podstawie liczby komórek w stosunku do skorygowanego wskaźnika skuteczności klonowania w kontrolach ujemnych (którym przypisano wskaźnik przeżycia wynoszący 100 %) (odpowiedni wzór zawarto w dodatku 2).

19. Należy ocenić co najmniej cztery badane stężenia (poza kontrolami z rozpuszczalnikiem i kontrolami dodatnimi), które spełniają kryteria dopuszczalności (odpowiednia cytotoksyczność, liczba komórek itp.). Choć zaleca się korzystanie ze zduplikowanych kultur, w odniesieniu do każdego badanego stężenia dopuszcza się możliwość stosowania kontrprób albo pojedynczych kultur poddawanych działaniu substancji. Wyniki uzyskane na podstawie niezależnych zduplikowanych kultur przy danym stężeniu należy zgłaszać odrębnie, ale dopuszcza się możliwość ich łączenia na potrzeby analizy danych (17). W przypadku badanych substancji chemicznych wykazujących niewielką cytotoksyczność lub niewykazujących cytotoksyczności na ogół odpowiednie będzie zastosowanie 2–3-krotnych przedziałów stężenia. W przypadku wystąpienia cytotoksyczności wybrane badane stężenia powinny obejmować zakres rozpoczynający się od stężenia, które wykazuje cytotoksyczność, oraz uwzględniający stężenia, w których wystąpiła umiarkowana i niewielka cytotoksyczność lub nie wystąpiła cytotoksyczność. W przypadku wielu badanych substancji chemicznych można zaobserwować strome krzywe ilustrujące zależność stężenie-odpowiedź, dlatego też aby uwzględnić cały zakres cytotoksyczności lub

▼M8

szczegółowo zbadać zależność stężenie-odpowiedź, konieczne może okazać się zastosowanie więcej niż czterech stężeń o bardziej zbliżonych wartościach – dotyczy to zwłaszcza przypadków, w których zachodzi konieczność powtórzenia doświadczenia (zob. pkt 43). Stosowanie więcej niż 4 stężeń może mieć szczególnie istotne znaczenie w przypadku korzystania z pojedynczych kultur.

20. Jeżeli maksymalne stężenie określono na podstawie cytotoksyczności, należy dążyć do tego, by poziom takiego maksymalnego stężenia doprowadził do uzyskania względnego wskaźnika przeżyć na poziomie od 20 do 10 %. Należy przy tym zachować ostrożność przy interpretowaniu wyników dodatnich uzyskiwanych wyłącznie przy względnym wskaźniku przeżyć na poziomie 10 % lub niższym (pkt 43).

21. W przypadku słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych, które nie wykazują cytotoksyczności w stężeniach niższych od najniższego stężenia nierozpuszczalnego, najwyższy poziom stężenia wykorzystanego w badaniu powinien wywołać zmętnienie lub doprowadzić do wytrącenia się osadu widocznego gołym okiem lub przez mikroskop odwrócony pod koniec poddawania działaniu badanej substancji. Nawet jeżeli cytotoksyczność wystąpi powyżej najniższego stężenia nierozpuszczalnego, zaleca się przeprowadzenie badania przy zastosowaniu wyłącznie jednego stężenia wywołującego zmętnienie lub skutkującego wytrącaniem się widocznego osadu, ponieważ osad może prowadzić do uzyskania zniekształconych wyników. W przypadku stężenia powodującego powstanie osadu należy zadbać, aby pojawienie się osadu nie zakłóciło przebiegu badania. Pomocne może okazać się oznaczenie rozpuszczalności w podłożu przed przeprowadzeniem doświadczenia.

22. Jeżeli nie zaobserwowano żadnego osadu ani ograniczenia cytotoksyczności, najwyższe badane stężenie powinno odpowiadać 10 mM, 2 mg/ml lub 2 µl/ml, w zależności od tego, która z tych wartości jest najniższa (39)(40). Jeżeli badana substancja chemiczna nie ma określonego składu, np. substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne (tj. substancje chemiczne o nieznanym lub zmiennym składzie (UVCB)) (41), wyciągi pochodzące ze środowiska itp., może być konieczne podwyższenie najwyższego stężenia (np. do 5 mg/ml) w przypadku braku dostatecznej cytotoksyczności, aby zwiększyć stężenie każdego ze składników. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że wymagania te mogą być inne w przypadku produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi (42).

Kontrole

23. Dla każdego warunku doświadczalnego należy włączyć jednoczesne kontrole ujemne (zob. pkt 16) obejmujące sam rozpuszczalnik w podłożu użytym do badania, w odniesieniu do których podjęto takie same czynności jak w odniesieniu do kultur poddanych działaniu substancji.

24. Jednoczesne kontrole dodatnie są niezbędne do wykazania zdolności danego laboratorium do zidentyfikowania mutagenów w warunkach określonych w zastosowanym protokole badania oraz, w stosownych przypadkach, skuteczności egzogennego układu metabolizującego. W tabeli 1 poniżej przedstawiono przykłady kontroli dodatnich. W uzasadnionych przypadkach dopuszcza się możliwość stosowania alternatywnych substancji służących do kontroli dodatniej. Ponieważ badania na komórkach ssaków *in vitro* pod kątem toksyczności genetycznej są w dostatecznym stopniu znormalizowane, badania, w których komórki poddaje się działaniu substancji z udziałem i bez udziału egzogennej aktywacji metabolicznej, można przeprowadzić wyłącznie przy wykorzystaniu kontroli dodatniej wymagającej aktywacji metabolicznej. W takim przypadku wspomniana pojedyncza reakcja kontroli dodatniej potwierdzi zarówno aktywność układu metabolizującego, jak i reaktywność układu badawczego. Każdą kontrolę dodatnią należy zastosować z co najmniej jednym stężeniem, w odniesieniu do którego oczekuje się uzyskania odtwarzalnych oraz wykrywalnych wzrostów powyżej tła, w celu wykazania czułości układu badawczego, przy czym reakcja nie powinna być zakłócona cytotoksycznością wykraczającą poza limity określone w niniejszej metodzie badawczej (zob. pkt 20).

▼M8

Tabela 1

Substancje odniesienia, z których zaleca się korzystać przy przeprowadzaniu oceny biegłości laboratorium i przy dokonywaniu wyboru kontroli dodatnich

Warunek aktywacji metabolicznej	Locus	Substancja i nr CAS
Brak egzogennej aktywacji metabolicznej	*HPRT*	Metanosulfonat etylu [nr CAS 62-50-0] Nitrozomocznik etylu [nr CAS 759-73-9] 1-tlenek-4-nitrochinoliny [nr CAS 56-57-5]
	XPRT	Streptonigryna [nr CAS 3930-19-6] Mitomycyna C [nr CAS 50-07-7]
Obecność egzogennej aktywacji metabolicznej	*HPRT*	3-metylocholantren [nr CAS 56-49-5] 7,12-antracen dimetylobenzenu [nr CAS 57-97-6] Benzo[a]piren [nr CAS 50-32-8]
	XPRT	Benzo[a]piren [nr CAS 50-32-8]

PROCEDURA

Poddanie działaniu badanej substancji chemicznej

25. Rozmnażające się komórki są poddawane działaniu badanej substancji chemicznej z udziałem i bez udziału układu metabolizującego. Narażenie na działanie badanej substancji powinno trwać dostatecznie długo (z reguły przyjmuje się, że odpowiedni okres narażenia na działanie substancji wynosi od 3 do 6 godzin).

26. Minimalną liczbę komórek wykorzystywanych w odniesieniu do każdej kultury (kontrolnej i poddawanej działaniu substancji) na poszczególnych etapach badania należy ustalić na podstawie wskaźnika spontanicznej częstości występowania mutacji. Ogólnie zaleca się poddawanie działaniu substancji i pasażowanie takiej liczby komórek, która będzie wystarczająca, aby utrzymać poziom 10 spontanicznie powstałych zmutowanych komórek w każdej kulturze na wszystkich etapach badania (17). Częstość spontanicznej mutacji waha się zazwyczaj w przedziale od 5 do 20 × 10-6. W przypadku gdy częstość występowania spontanicznej mutacji wynosi 5 × 10-6, utrzymanie wystarczającej liczby spontanicznie zmutowanych komórek (przynajmniej 10) również w kulturach poddanych działaniu substancji w stężeniach powodujących cytotoksyczność na poziomie 90 % (względny wskaźnik przeżyć wynoszący 10 %) wiązałoby się z koniecznością poddania działaniu substancji co najmniej 20 × 106 komórek. Ponadto w okresie ekspresji należy wyhodować wystarczającą liczbę komórek (co najmniej 2 mln), a następnie posiać te komórki w celu dokonania wyboru zmutowanych komórek (17).

Czas ekspresji fenotypowej i pomiar częstości występowania mutacji

27. Po zakończeniu okresu poddawania działaniu substancji komórki hoduje się, aby umożliwić ekspresję fenotypu mutanta. Na ogół okres wynoszący co najmniej 7–9 dni wystarczy do zapewnienia niemal optymalnej ekspresji fenotypowej nowo wywołanych mutacji HPRT i XPRT (43)(44). W tym okresie z komórek regularnie wydziela się kultury pochodne, aby podtrzymać ich wzrost wykładniczy. Po zakończeniu okresu ekspresji fenotypowej komórki ponownie posiewa się na podłożu z udziałem lub bez udziału czynnika selektywnego (6-tioguaniny), aby odpowiednio ustalić liczbę mutantów i określić skuteczność klonowania w momencie dokonywania wyboru. Takiego posiewu można dokonać przy wykorzystaniu płytek do jednowarstwowej hodowli kultur lub mikropłytek do komórek w zawiesinie. Na potrzeby wyboru mutantów komórki powinny zostać posiane z gęstością zapewniającą optymalny poziom pozyskiwania mutantów (tj. aby nie doszło do sprzężenia metabolicznego) (17). Posiane komórki inkubuje się przez odpowiedni czas, aby zapewnić optymalne tempo wzrostu kolonii (np. 7–12 dni), po czym liczy się kolonie. Częstość występowania mutacji oblicza się na podstawie liczby kolonii zmutowanych komórek skorygowanej o wartość wskaźnika skuteczności klonowania w momencie wyboru zmutowanych komórek (stosowne wzory przedstawiono w dodatku 2).

▼M8

Biegłość laboratorium

28. Aby ustalić, czy dane laboratorium ma dostateczne doświadczenie w zakresie przedmiotowego badania przed zastosowaniem go w rutynowych badaniach, powinno ono przeprowadzić szereg doświadczeń z wykorzystaniem referencyjnych substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej, działających za pomocą różnych mechanizmów (co najmniej jedna substancja aktywna z udziałem aktywacji metabolicznej i jedna substancja aktywna bez udziału aktywacji metabolicznej, wybrane spośród substancji wymienionych w tabeli 1) oraz różnych kontroli ujemnych (różnych rozpuszczalników/nośników). Reakcje otrzymane w wyniku takiej kontroli dodatniej i ujemnej powinny odpowiadać reakcjom opisanym w literaturze. Nie dotyczy to laboratoriów, które mają odpowiednie doświadczenie, tj. laboratoriów prowadzących bazę danych historycznych, o której mowa w pkt 30–33.

29. Aby wykazać biegłość w zakresie wykrywania mutagennych substancji chemicznych, oznaczania skuteczności układu metabolizującego i wykazywania adekwatności warunków wzrostu komórek poddawanych działaniu substancji, ekspresji fenotypowej i wyboru mutantów oraz procedur oceny punktowej, należy zbadać szereg substancji chemicznych z udziałem i bez udziału aktywacji metabolicznej (zob. tabela 1 pkt 25). Należy dobrać zakres stężeń wybranych substancji tak, aby uzyskać powtarzalne i powiązane ze stężeniem wzrosty powyżej tła w celu wykazania czułości i zakresu oznaczania układu badawczego.

Dane historyczne dotyczące kontroli

30. Laboratorium powinno ustalić:

— zakres i rozkład historycznych wyników kontroli dodatniej,

— zakres i rozkład historycznych wyników kontroli ujemnej (bez poddania działaniu substancji chemicznej, z rozpuszczalnikiem).

31. Przy pierwszym gromadzeniu danych dotyczących rozkładu historycznych wyników kontroli ujemnych wyniki jednoczesnych kontroli ujemnych powinny być zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli (22). W miarę dodawania kolejnych danych doświadczalnych do rozkładu kontroli najlepiej byłoby, gdyby jednoczesne kontrole ujemne mieściły się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % tego rozkładu (17)(45)(46).

32. Prowadzona przez dane laboratorium baza danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych powinna początkowo zawierać dane z co najmniej 10 doświadczeń, a najlepiej z co najmniej 20 doświadczeń przeprowadzonych w porównywalnych warunkach doświadczalnych. Laboratoria powinny stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (47)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych dotyczących kontroli dodatniej i ujemnej oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest „pod kontrolą” (46). Dalsze zalecenia dotyczące sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych (tj. kryteria włączania danych do zbioru danych historycznych i wykluczania danych z tego zbioru oraz kryteria dopuszczalności dla danego doświadczenia) można znaleźć w literaturze (45).

33. Dane dotyczące kontroli ujemnej powinny obejmować częstość występowania mutacji w pojedynczej kulturze lub, najlepiej, w zduplikowanych kulturach, jak opisano w pkt 23. Najlepiej byłoby, gdyby jednoczesne kontrole ujemne mieściły się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % rozkładu danych zawartych w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych) (17)(45)(46). Jeżeli dane dotyczące jednoczesnych kontroli ujemnych nie mieszczą się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 %, włączenie ich do rozkładu kontroli historycznej może być dopuszczalne, pod warunkiem że dane te nie stanowią skrajnych obserwacji nietypowych oraz że istnieją dowody świadczące o tym, iż dany układ badawczy znajduje się „pod kontrolą” (zob. powyżej), a także dowody wykluczające błąd techniczny czy ludzki.

▼M8

34. Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem ich spójności z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wszelkie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Przedstawienie wyników

35. Przedstawienie wyników powinno obejmować wszystkie dane niezbędne do obliczenia poziomu cytotoksyczności (wyrażonej jako względny wskaźnik przeżyć). Wspomniane dane, które dotyczą zarówno kultur poddanych działaniu substancji, jak i kultur kontrolnych, powinny uwzględniać liczbę komórek pod koniec poddawania działaniu substancji, liczbę komórek posianych bezpośrednio po zakończeniu poddawania działaniu substancji oraz liczbę kolonii (lub liczbę dołków bez kolonii w przypadku metody mikropłytkowej). Względny wskaźnik przeżyć dla każdej kultury powinien zostać wyrażony jako odsetek w stosunku do równoczesnej kontroli z rozpuszczalnikiem (zob. dodatek 1, aby zapoznać się ze stosownymi definicjami).

36. Przedstawienie wyników powinno również obejmować wszystkie dane niezbędne do obliczenia częstości występowania mutacji. Dane dotyczące zarówno kultur poddanych działaniu substancji, jak i kultur kontrolnych, powinny obejmować: 1) liczbę komórek posianych z udziałem lub bez udziału czynnika selektywnego (w momencie posiewu komórek w celu wybrania komórek zmutowanych) oraz 2) liczbę kolonii (lub liczbę dołków bez kolonii w przypadku metody mikropłytkowej) na płytkach z czynnikiem selektywnym lub bez tego czynnika. Częstość występowania mutacji oblicza się na podstawie liczby kolonii zmutowanych komórek (na płytkach z czynnikiem selektywnym) skorygowanej o wartość wskaźnika skuteczności klonowania w momencie wyboru zmutowanych komórek (z płytek bez czynnika selektywnego). Częstość występowania mutacji powinna być wyrażona jako liczba zmutowanych komórek na milion komórek żywotnych (zob. dodatek 1, aby zapoznać się ze stosownymi definicjami).

37. Należy dostarczyć dane dotyczące poszczególnych kultur. Dodatkowo wszystkie dane należy przedstawić w postaci tabeli.

Kryteria dopuszczalności

38. Dopuszczalność testu ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

— uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących równoczesnych kontroli ujemnych do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych, jak opisano w pkt 33;

— równoczesne kontrole dodatnie (zob. pkt 24) powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną;

— zbadano dwa warunki doświadczalne (z udziałem i bez udziału aktywacji metabolicznej) do momentu uzyskania w jednym z nich wyników dodatnich (zob. pkt 25);

— można poddać analizie wystarczającą liczbę komórek i stężeń (pkt 25, 26 i 19);

— kryteria wyboru najwyższego stężenia są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 20, 21 i 22.

Ocena i interpretacja wyników

39. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik jednoznacznie dodatni, jeżeli w dowolnych ze zbadanych warunków doświadczalnych:

▼M8

— co najmniej jedno z badanych stężeń wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,

— ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany ze stężeniem,

— którykolwiek z wyników znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicą kontrolną wyznaczającą przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 33).

W przypadku gdy wszystkie wspomniane kryteria zostały spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna jest w stanie wywołać mutacje genowe w hodowanych komórkach ssaków w danym układzie badawczym. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można znaleźć w literaturze (46)(48).

40. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności zostały spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik jednoznacznie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych:

— żadne z badanych stężeń nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,

— ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany ze stężeniem,

— wszystkie wyniki mieszczą się w rozkładzie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 33).

Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za niezdolną do wywołania mutacji genowych w hodowanych komórkach ssaków w danym układzie badawczym.

41. Weryfikacja jednoznacznie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

42. Jeżeli reakcja nie jest ani jednoznacznie ujemna, ani jednoznacznie dodatnia, jak opisano powyżej, oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku, dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub dalsze badania. Przydatne może być powtórne przeprowadzenie doświadczenia, potencjalnie z zastosowaniem zmienionych warunków doświadczalnych (np. odstępów czasu między stężeniami, innych warunków aktywacji metabolicznej (tj. stężenie S9 lub pochodzenie S9)).

43. W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne. W takiej sytuacji należy uznać, że reakcja badanej substancji chemicznej jest niejednoznaczna (tj. może zostać zinterpretowana zarówno jako dodatnia, jak i jako ujemna).

Sprawozdanie z badania

44. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli jest dostępny;

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;

— rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane;

— pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, stosownie do przypadku.

▼**M8**

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Rozpuszczalnik:

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika;

— zawartość procentowa rozpuszczalnika w końcowym podłożu.

Komórki:

W przypadku głównych kultur laboratoryjnych:

— rodzaj i źródło komórek oraz linie komórkowe;

— liczba pasaży – o ile informacje na ten temat są dostępne – i dane historyczne dostępne w laboratorium;

— cechy kariotypu lub zmienna liczba chromosomów;

— metody utrzymywania kultur komórkowych;

— brak mykoplazmy;

— czasy podwojenia komórek.

Warunki badania:

— uzasadnienie wyboru stężeń oraz liczby kultur, z uwzględnieniem np. danych dotyczących cytotoksyczności oraz granic rozpuszczalności;

— skład podłoża, stężenie CO_2, poziom wilgotności;

— stężenie badanej substancji chemicznej wyrażone jako stężenie końcowe w podłożu (np. µg lub mg/ml lub mM podłoża);

— stężenie (lub objętość) rozpuszczalnika i badanej substancji chemicznej dodanych do podłoża;

— temperatura inkubacji;

— okres inkubacji;

— czas poddawania działaniu substancji chemicznej;

— zagęszczenie komórek w trakcie poddawania działaniu substancji;

— typ oraz skład układu metabolizującego (źródło frakcji S9, metoda przygotowania preparatu frakcji S9, stężenie lub objętość preparatu frakcji S9 i frakcji S9 w końcowym podłożu, kontrole jakości frakcji S9);

— substancje służące do kontroli dodatniej i ujemnej, stężenia końcowe w poszczególnych warunkach poddawania działaniu substancji chemicznej;

▼**M8**

— długość okresu ekspresji (w tym liczba posianych komórek i podkultur oraz – w stosownych przypadkach – schematy żywienia);

— nazwa czynnika selektywnego i jego stężenie;

— kryteria dopuszczalności badań;

— metody wykorzystywane do wyliczenia liczby żywotnych i zmutowanych komórek;

— metody wykorzystywane do pomiaru cytotoksyczności;

— wszelkie informacje uzupełniające istotne w kontekście cytotoksyczności i stosowanej metody;

— czas trwania okresów inkubacji po posiewie;

— kryteria uznawania wyników badań za dodatnie, ujemne lub niejednoznaczne;

— metody stosowane w celu ustalenia poziomu pH, osmolalności i strącania.

Wyniki:

— liczba komórek poddanych działaniu substancji chemicznej i liczba komórek w hodowli pochodnej z każdej kultury;

— wyniki pomiaru cytotoksyczności oraz ewentualne inne obserwacje;

— oznaki strącania i czas oznaczenia;

— liczba komórek posianych na podłożu selektywnym i nieselektywnym;

— liczba kolonii na podłożu nieselektywnym i liczba odpornych kolonii na podłożu selektywnym oraz powiązane częstości występowania mutacji;

— w stosownych przypadkach zależność stężenie-odpowiedź;

— dane dotyczące jednoczesnych kontroli ujemnych (z rozpuszczalnikiem) i dodatnich (stężenia i rozpuszczalniki);

— dane historyczne dotyczące kontroli ujemnych (z rozpuszczalnikiem) i dodatnich wraz z zakresami, średnimi i odchyleniami standardowymi oraz przedziałem ufności (np. 95 %), przy uwzględnieniu również ilości danych;

— analizy statystyczne (dla poszczególnych kultur oraz, w stosownych przypadkach, połączonych kontrprób) oraz p-wartości, jeżeli występują.

Omówienie wyników.

Wniosek

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2016). *Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015.* [W:] Publikacje na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny nr 234. Paryż: OECD.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. i Tindall, K.R. (red.) (1987). *Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis.* Cold Spring Harbor Laboratory, Nowy Jork, 1987.

▼**M8**

(3) E. H. Y. Chu i H. V. Malling (1968). *Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells In Vitro*. „Proc. Natl. Acad. Sci., USA". nr 61, s. 1306–1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. i Dearfield K.L. (1989). *Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci*. „Mutagen." Res.„nr 4" s. 394–403.

(5) Aaron C.S. i Stankowski Jr. L.F. (1989). *Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates*. „Mutation Res." nr 223, s. 121–128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. i Thompson E. (1994). *Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures*. „Mutation Res." nr 312, s. 235–239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. i 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." nr 196, s. 17–36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. i Myhr B.C. (1991). *Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9*. „Mutation Res." nr 257, s. 147–204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. i Okumura K. (1992). *Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells*. „Mutation Res." nr 268, s. 297–305.

(10) Brusick D. (1986). *Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations*. „Environ. Mutagen." nr 8, s. 789–886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. i Marzin D. (2008). *Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid*. „Environ. Mol. Mutation Res." nr 49, s. 439–452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. i 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." nr 634, s. 177–183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L. i 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." nr 584, s. 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. i Yang L.L. (1987). *A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay*. „Mutation Res." nr 189, s. 135–141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. i 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." nr 216, s. 9–17.

(16) L. F. Jr. Stanowski, K. R. Tindall i A. W. Hsie (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." nr 160, s. 133–147.

▼**M8**

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. i Asquith J.C. (1989). *Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation*, [W:] *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland (red.), Cambridge University Press, s. 66–101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P. i 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." nr 86, s. 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." nr 85, s. 165–175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R. i Hsie A.W. (1984). *Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells*. „Mol. Cell. Biol." nr 4, s. 1411–1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M. i Schenley R. L. (1986). *Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells.* „Proc Natl Acad Sci." nr 83(24), s. 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. *Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing*. (Tekst w przygotowaniu).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. i Stokes W. (2005). *Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice*. „ATLA" nr 33, s. 261–287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. i Stich H.F. (1980). *Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures*. „Can. Lett." nr 8, s. 299–305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. i 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." nr 37, s. 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. i Mazzaccaro A. (1977). *Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine*. „Mutation Res." nr 46, s. 365–373.

(27) Ames B.N., McCann J. i Yamasaki E. (1975). *Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test*. „Mutation Res." nr 31, s. 347–364.

(28) Maron D.M. i Ames B.N. (1983). *Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test*. „Mutation Res." nr 113, s. 173–215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. i Wolf R.C. (1992). *Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays*. „Mutagen." nr 7, s. 175–177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. i Sugimura T. (1976). *A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems*, [W:] In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. i Philpot R.M. (red.). Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

▼**M8**

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. i 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." nr 4, s. 55–65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. i 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." nr 28, s. 51–59.

(33) UNEP (2001). Konwencja sztokholmska w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych, Program Narodów Zjednoczonych ds. Ochrony Środowiska (UNEP). Dostępne na stronie internetowej: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. i 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." nr 84, s. 147–156.

(35) J. P. O'Neill, R. Machanoff, J. R. San Sebastian i A. W. Hsie (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. „Environ. Mol. Mutation." nr 4, s. 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.", nr 4, s. 7–18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. i McCooey K.T. (1982). *CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids.* [W:] Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (red.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Nowy Jork, Plenum, s. 91–103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. i Brooks A.L. (1983). *for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay.* „Environ. Mutagenesis"., nr 5, s. 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).* Dostępny na żądanie od Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(40) Brookmire L., Chen J.J. i Levy D.D. (2013). *Evaluation of the Highest Concentrations Used in the in vitro Chromosome Aberrations Assay.* „Environ. Mol. Mutation.", nr 54, s. 36–43.

(41) EPA, Urząd ds. Bezpieczeństwa Substancji Chemicznych i Zapobiegania Zanieczyszczeniom. (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.* Dostępne na stronie internetowej: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. i 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. i Au W.W. (1995). *Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells.* „Mutation Research" nr 1335(2), s. 121–128.

▼**M8**

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., i Thybaud V. (2011). *Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data*, [w:] „Mutation Research" nr 723, s. 87–90.

(46) OECD (2014). *Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines* [w:] Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr 199), Paryż: Organisation for Economic Cooperation and Development.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., i Phillips B. (1989). *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays*. [W:] *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data.* D.J. Kirkland (red.) Cambridge: Cambridge University Press, s. 141–154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., i Paik M. C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, wydanie trzecie, Nowy Jork: *John Wiley & Sons*.

▼**M8**

Dodatek 1

DEFINICJE

Mutageny powodujące substytucję: substancje chemiczne, które powodują podstawienie par zasad w DNA.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Skuteczność klonowania: odsetek komórek posiewanych z niską gęstością, będących w stanie przekształcić się w zdatną do zliczenia kolonię.

Stężenia: odnoszą się do stężeń końcowych badanej substancji chemicznej w podłożu.

Cytotoksyczność: W odniesieniu do testów objętych niniejszą metodą badawczą cytotoksyczność określa się jako obniżenie względnego wskaźnika przeżyć komórek poddanych działaniu substancji w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. odpowiedni pkt).

Mutacja pierwotna: mutacja genu z rodzaju macierzystego do mutanta, który powoduje zmianę lub stratę aktywności enzymatycznej funkcji zakodowanego białka.

Mutageny typu zmiany fazy odczytu: substancje chemiczne, które powodują dodanie lub delecję pojedynczej pary zasad lub wielu par zasad w cząstce DNA.

Genotoksyczny: termin ogólny, obejmujący wszystkie rodzaje uszkodzeń DNA lub chromosomu, w tym pęknięcia, przegrupowania adduktów, mutacje, aberracje chromosomowe i aneuploidię. Nie wszystkie rodzaje skutków genotoksycznych powodują mutacje lub stałe uszkodzenia chromosomu.

Podłoże HAT: podłoże wykorzystywane do czyszczenia mutantów fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej, zawierające hipoksantynę, aminopterynę oraz tymidynę.

Rekombinacja mitotyczna: zachodząca podczas mitozy rekombinacja między chromatydami homologicznymi, której możliwe skutki to indukowanie pęknięć łańcucha DNA lub utrata heterozygotyczności.

Podłoże MPA: podłoże wykorzystywane do czyszczenia mutantów fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej zawierające ksantynę, adeninę, tymidynę, aminopterynę oraz kwas mykofenolowy.

Mutagenny: powoduje dziedziczne zmiany w sekwencji lub sekwencjach par zasad DNA w genach lub w strukturze chromosomów (aberracje chromosomowe).

Częstość występowania mutacji (MF): liczba zaobserwowanych kolonii zmutowanych komórek podzielona przez liczbę komórek posianych w podłożu selektywnym, skorygowana podczas wyboru względem skuteczności klonowania (lub żywotności).

Czas ekspresji fenotypowej: czas po poddaniu działaniu substancji chemicznej, w trakcie którego zmiana genetyczna utrwalana jest w genomie, a wszelkie istniejące wcześniej produkty genu zostają oddzielone w takim stopniu, że zmianie ulega cecha fenotypowa.

Względny wskaźnik przeżyć (RS): względny wskaźnik przeżyć wykorzystuje się do mierzenia cytotoksyczności związanej z działaniem substancji chemicznej. Względny wskaźnik przeżyć to wskaźnik skuteczności klonowania komórek posianych natychmiast po poddaniu działaniu substancji chemicznej, skorygowany o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji w stosunku do wskaźnika skuteczności klonowania w kontrolach ujemnych (którym przypisano wskaźnik przeżycia wynoszący 100 %).

Frakcje S9 uzyskane z wątroby: supernatant z homogenatu wątroby po odwirowaniu przy 9 000 g, tj. surowy ekstrakt z wątroby.

▼**M8**

Preparat frakcji S9: preparat złożony z frakcji S9 uzyskanej z wątroby i kofaktorów niezbędnych do aktywności metabolicznej enzymów.

Kontrola z rozpuszczalnikiem: ogólny termin opisujący kultury kontrolne otrzymujące wyłącznie rozpuszczalnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Kontrola niepoddawana działaniu substancji: hodowle, które nie są poddawane działaniu żadnej substancji (tj. ani badanej substancji chemicznej, ani rozpuszczalnika), lecz które są poddawane zabiegom równolegle i w taki sam sposób jak hodowle otrzymujące badaną substancję chemiczną.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

▼M8

Dodatek 2

WZORY DO CELÓW OCENY CYTOKSYCZNOŚCI ORAZ CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA MUTACJI

Ocenę cytotoksyczności przeprowadza się w oparciu o względny wskaźnik przeżyć, tj. wskaźnik skuteczności klonowania komórek posianych natychmiast po poddaniu działaniu substancji, skorygowany o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji w stosunku do skorygowanej skuteczności klonowania w kontrolach ujemnych (którym przypisano wskaźnik przeżycia wynoszący 100 %) (zob. poniżej wzór dotyczący względnego wskaźnika przeżyć).

Skorygowaną skuteczność klonowania kultury poddanej działaniu badanej substancji chemicznej oblicza się w następujący sposób:

$$\text{Skorygowana SK} = \frac{\text{Liczba komórek pod koniec okresu narażenia}}{\text{Liczba komórek na początku okresu narażenia}}$$

Względny wskaźnik przeżyć kultury poddanej działaniu badanej substancji chemicznej oblicza się w następujący sposób:

$$\text{RS} = \frac{\text{Skorygowana SK wkulturze poddanej działaniu}}{\text{Skorygowana SK wkontroli zrozpuszczalnikiem}} \times 100$$

Częstość występowania mutacji jest to skuteczność klonowania kolonii zmutowanych komórek w podłożu selektywnym podzielona przez skuteczność klonowania w podłożu nieselektywnym, mierzona podczas dokonywania wyboru w odniesieniu do tej samej kultury.

$$\text{Częstość wyst. mutacji} = \frac{\text{SK kolonii zmutowanych wpodłożu selektywnym}}{\text{SK wpodłożu nieselektywnym}}$$

Gdy stosuje się płytki w odniesieniu do skuteczności klonowania:

Skuteczność klonowania = liczba kolonii / liczba posianych komórek

Gdy stosuje się mikropłytki w odniesieniu do skuteczności klonowania:

Liczba kolonii na dołek w mikropłytkach jest zgodna z rozkładem Poissona.

Skuteczność klonowania = -LnP(0) / liczba posianych komórek na dołek

Gdzie -LnP(0) jest to prawdopodobna liczba pustych dołków pośród dołków posianych, określana według następującego wzoru:

LnP(0)= -Ln (liczba pustych dołków / liczba posianych dołków)

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21. **BADANIE PRZEMIANY KOMÓRKOWEJ SSAKÓW *IN VITRO***

1. **METODA**

1.1. WSTĘP

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

1.2. DEFINICJE

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Systemy hodowli komórkowej ssaków mogą być zastosowane w celu wykrycia zmian fenotypowych *in vitro* wywołanych substancjami chemicznymi związanymi ze złośliwymi przemianami *in vivo*. Powszechnie używane komórki, takie jak C3H10TV2, 3T3, SHE, szczura Fischera i testowe polegają na ocenie zmian w morfologii komórki, formowania skupisk czy zależności od zakotwiczenia w półstałym agarze. Istnieją systemy rzadziej stosowane, które pozwalają wykryć inne zmiany fizjologiczne lub morfologiczne w komórkach w następstwie ekspozycji na substancję rakotwórczą. Żadne testy końcowe badania *in vitro* nie mają ustalonego bezpośredniego powiązania z nowotworem. Niektóre systemy badawcze są w stanie wykryć aktywatory guzów. Cytototoksyczność można ustalić przez określenie wpływu badanego materiału na zdolności formowania kolonii (wydajność klonowania) lub wskaźniki wzrostu kultury. Pomiar cytotoksyczności ma na celu ustalenie, że ekspozycja na działanie substancji testowej jest istotna pod względem toksykologicznym, ale nie może być wykorzystywana w celu obliczenia częstotliwości przemian we wszystkich próbach, ponieważ niektóre mogą obejmować długotrwałą inkubację i/lub pasażowanie.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

Brak.

1.6. OPIS METODY BADAWCZEJ

Przygotowania

K o m ó r k i

W zależności od stosowanego badania przemian dostępne są różne linie komórkowe lub komórki podstawowe. Badacz musi zapewnić, iż komórki wykorzystywane w przeprowadzanym badaniu wykazują właściwe zmiany fenotypowe w następstwie poddania działaniu znanym czynnikom rakotwórczym oraz że badanie, przeprowadzane w laboratorium badacza, jest potwierdzone i posiada udokumentowaną wiarygodność.

P o ż y w k a k u l t u r

Należy zastosować pożywkę oraz warunki doświadczalne właściwe dla prób przemiany komórkowej.

▼B

Substancja testowa

Substancja testowa może zostać przygotowana na pożywce hodowlanej lub rozpuszczona lub zawieszona we właściwych nośnikach przed rozpoczęciem badania komórek. Stężenie końcowe nośnika w systemie hodowli nie powinno wpływać na żywotność komórki, tempo wzrostu ani na częstotliwość przemian.

Aktywacja metaboliczna

Komórki należy poddać działaniu substancji testowej zarówno w obecności jak i przy braku obecności właściwego systemu aktywacji metabolicznej. Alternatywnie, w przypadku użycia rodzaju komórek z wrodzoną aktywacją metaboliczną, wskaźnik charakteru aktywności powinien być znany, aby był właściwy dla badanej klasy chemicznej.

Warunki badania

Użycie negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych

Pozytywne grupy kontrolne, używając zarówno bezpośrednio działającego związku, jak i związku wymagającego metabolicznej aktywacji, należy włączyć do każdego badania; należy uwzględnić również negatywną grupę kontrolną, której podawany jest nośnik.

Poniższe substancje są przykładami substancji, które mogą być użyte jako pozytywne grupy kontrolne:

— związki działające bezpośrednio:

  — etylometanosulfonian,

  — ß-propiolakton,

— związki wymagające aktywacji metabolicznej:

  — acetylaminofluoren,

  — 4-dimetyloaminoazobenzen,

  — 7,12-dimetylobenzantracen.

W odpowiednich przypadkach można włączyć dodatkową pozytywną grupę kontrolną tej samej klasy chemicznej co związek używany w badaniu.

Stężenia oddziałującej substancji

Należy użyć kilka stężeń substancji testowej. Niniejsze stężenia powinny wywołać objawy toksyczności z nimi związane, przy najwyższym stężeniu powodować niski poziom komórek pozostałych przy życiu oraz poziom żywotności komórek przy najniższym stężeniu, oscylujący w przybliżeniu na tym samym poziomie, co przy stężeniu użytym w negatywnej grupie kontrolnej. Odpowiednio, substancje nierozpuszczalne w wodzie należy badać do granicy ich rozpuszczalności, wykorzystując właściwe procedury. Dla substancji nietoksycznych łatwo rozpuszczalnych w wodzie wyższe stężenie substancji testowej należy rozpatrywać dla każdego przypadku oddzielnie.

▼B

Procedura

Komórki należy poddać działaniu substancji przez określony okres czasu, w zależności od stosowanego systemu badań, może to dotyczyć ponownego dawkowania wraz ze zmianą pożywki do hodowli (i w miarę potrzeby, świeżą mieszaninę aktywacji metabolicznej) w przypadku długotrwałej ekspozycji na działanie substancji testowej. Komórki nieposiadające odpowiedniej wrodzonej aktywności metabolicznej należy poddać ekspozycji na substancję testową w obecności i bez obecności właściwego systemu aktywności metabolicznej. Pod koniec okresu ekspozycji komórki są przepłukiwane w celu usunięcia substancji testowej i hodowane w warunkach odpowiednich dla monitorowania momentu pojawienia się zmienionego fenotypu i zasięgu transformacji. Wszelkie wyniki potwierdzane są niezależnym badaniem.

2. **DANE**

Dane powinny być opracowane w formie tabeli i mogą wymagać uwzględnienia różnorodności form zgodnie z metodą oznaczenia, która została użyta, np. zliczanie płytek, płytki pozytywne bądź ilość stransformowanych komórek. Jeżeli jest to odpowiednia metoda, ilość komórek, które przeżyły, powinna być wyrażona jako procent poziomu kontroli i częstotliwości występowania ekspresji wyrażonej jako stosunek ilości komórek stransformowanych do komórek, które przeżyły ekspozycję. Dane należy przeanalizować za pomocą właściwych metod statystycznych.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— rodzaj użytej komórki, liczba kultur komórkowych, metody utrzymania kultur komórkowych,

— warunki badania: stężenie substancji, użyty nośnik, czas inkubacji, czas trwania oraz częstotliwość badania, gęstość komórkowa podczas badania, rodzaj użytego egzogenicznego systemu aktywacji metabolicznej, pozytywne i negatywne grupy kontrolne, specyfikacja kontrolowanego fenotypu, zastosowany system wyboru (odpowiednio do potrzeb), racjonalna podstawa wyboru dawkowania,

— metody stosowane do liczenia żywych i zmienionych komórek,

— statystyczna analiza,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. ANALIZA I INTERPRETACJA

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

4. **ODNIESIENIA**

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

▼**M8**

B.22. **BADANIE DOMINUJĄCEGO GENU LETALNEGO GRYZONIA**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 478 (2016). Metody badawcze są okresowo poddawane przeglądowi w związku z postępem naukowym, zmieniającymi się potrzebami regulacyjnymi oraz troską o dobrostan zwierząt. Niniejsza zmodyfikowana wersja metody badawczej jest efektem ponad trzydziestoletniego doświadczenia w przeprowadzaniu tego badania i odzwierciedla potencjał integracji lub łączenia tego badania z innymi badaniami dotyczącymi toksyczności, takimi jak badania rozwojowe, badania toksyczności reprodukcyjnej lub genotoksyczności; jednak z powodu tych ograniczeń oraz wykorzystania dużej liczby zwierząt nie zaleca się stosować tego testu jako podstawowej metody, a raczej traktować jako metodę dodatkową, którą można stosować jedynie w przypadku gdy w odniesieniu do wymogów regulacyjnych nie istnieje metoda alternatywna. Połączenie badań toksyczności może uchronić dużą liczbę zwierząt przed wykorzystaniem ich w takich badaniach. OECD opracowała dokument, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd najnowszych zmian, jakie wprowadzono do wytycznych OECD dotyczących badań w zakresie toksykologii genetycznej (1).

2. Celem badania dominującej mutacji letalnej jest ustalenie, czy substancje chemiczne wytwarzają w komórkach germinalnych mutacje wynikające z aberracji chromosomowych. Ponadto badanie dominującego genu letalnego ma istotne znaczenie dla oceny genotoksyczności, ponieważ czynniki związane z metabolizmem *in vivo*, farmakokinetyką oraz procesami naprawy DNA – choć mogą różnić się w zależności od gatunku – są aktywne i wywierają wpływ na reakcję. Indukcja dominującej mutacji letalnej po narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej wskazuje, że substancja chemiczna wpłynęła na tkankę rozrodczą zwierzęcia laboratoryjnego.

3. Mutacje dominującego genu letalnego powodują śmierć embrionu lub stratę płodu. Indukcja dominującej mutacji letalnej po narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej wskazuje, że substancja chemiczna wpływa na komórki germinalne zwierzęcia laboratoryjnego.

4. Test dominującej mutacji letalnej jest użytecznym testem, który umożliwia potwierdzenie wyników dodatnich badań wykorzystujących somatyczne punkty końcowe *in vivo* oraz jest istotnym punktem końcowym pozwalającym przewidzieć zagrożenie wobec ludzi i ryzyko chorób genetycznych przekazywanych w linii germinalnej. Test ten jest jednak pracochłonny i wymaga wykorzystania dużej liczby zwierząt; w rezultacie jego przeprowadzenie jest bardzo kosztowne i czasochłonne. Z uwagi na fakt, że spontaniczna częstotliwość dominujących mutacji letalnych jest dość wysoka, czułość testu pod kątem wykrywania niewielkich wzrostów częstotliwości mutacji jest zasadniczo ograniczona.

5. Definicje kluczowych terminów zamieszczono w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

6. Badanie najczęściej przeprowadza się na myszach (2)(3)(4), jednak jeżeli jest to naukowo uzasadnione – w niektórych przypadkach dopuszcza się wykorzystanie innych gatunków, takich jak szczury (5)(6)(7)(8). Dominujące mutacje letalne są zazwyczaj skutkiem rażących aberracji chromosomowych (aberracji strukturalnych i liczbowych) (9)(10)(11), jednak niewykluczone są także mutacje genowe. Dominująca mutacja

▼M8

letalna to mutacja, która zachodzi *per se* w komórce germinalnej lub utrwala się po zapłodnieniu we wczesnym stadium embrionalnym; nie powoduje ona jednak dysfunkcji gamety, ale jest śmiertelna dla zapłodnionego jaja lub rozwijającego się embrionu.

7. Poszczególne samce wykorzystywane są do krycia dziewiczych samic sekwencyjnie w odpowiednich odstępach czasu. Liczba kryć następujących po zakończeniu badania jest zależna od ostatecznego celu badania dotyczącego dominującej mutacji letalnej (pkt 23) oraz powinna zapewnić możliwość przeprowadzenia oceny dojrzewania męskich komórek germinalnych pod kątem dominujących mutacji letalnych (12).

8. Jeżeli istnieją dowody świadczące o tym, że badana substancja chemiczna lub jej metabolit lub metabolity nie dotrą do jądra, nie należy przeprowadzać tego badania.

ZASADA BADANIA

9. Zasadniczo samce poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej z zastosowaniem odpowiedniej drogi narażenia i kryje nimi dziewicze samice, których nie poddano takiemu działaniu. Wykorzystując kolejne następujące po sobie okresy krycia można badać różne rodzaje komórek germinalnych. Po okresie krycia i upływie odpowiedniego czasu samice poddaje się eutanazji i bada ich macice, aby ustalić liczbę implantów oraz żywych i martwych embrionów. Letalność dominującą badanej substancji chemicznej określa się, porównując liczbę żywych zagnieżdżonych zarodków na samicę w grupie badanej do liczby żywych zagnieżdżonych zarodków na samicę w grupie kontrolnej z nośnikiem/rozpuszczalnikiem. Wzrost liczby martwych zagnieżdżonych zarodków na samicę w grupie badanej powyżej liczby martwych zagnieżdżonych zarodków na samicę w grupie kontrolnej odzwierciedla straty poimplantacyjne wywołane przez badaną substancję chemiczną. Straty poimplantacyjne oblicza się, określając stosunek martwych zagnieżdżonych zarodków do całkowitej liczby zagnieżdżonych zarodków w grupie badanej i porównując stosunek martwych zagnieżdżonych zarodków do ich całkowitej liczby w grupie kontrolnej. Straty przedimplantacyjne można oszacować, porównując liczby ciałek żółtych po odjęciu całkowitej liczby zagnieżdżonych zarodków lub całkowitej liczby zagnieżdżonych zarodków na samicę w grupie badanej i grupach kontrolnych.

WERYFIKACJA BIEGŁOŚCI LABORATORIUM

10. Kompetencje w zakresie przedmiotowego testu ustala się, wykazując zdolność do odtwarzania częstotliwości dominujących mutacji letalnych z opublikowanych danych (np. (13)(14)(15)(16)(17)(18)) z zastosowaniem substancji służących do kontroli dodatniej (w tym reakcji słabych), takich jak te wymienione w tabeli 1, oraz do grup kontrolnych nośnika, i uzyskując częstotliwości kontroli ujemnej posiadające akceptowalny pod względem spójności zakres danych (zob. powyższe odniesienia), lub z wykorzystaniem historycznego rozkładu kontroli laboratorium, gdy taki rozkład jest dostępny.

OPIS METODY

Czynności przygotowawcze

Wybór gatunku zwierząt

11. Badania należy prowadzać na zdrowych, dojrzałych płciowo laboratoryjnych szczepach zwierząt powszechnie wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych. Badania przeprowadza się zazwyczaj na myszach, choć właściwe może być również wykorzystywanie szczurów. Dopuszcza się również możliwość wykorzystania wszelkich innych odpowiednich gatunków ssaków, o ile zostanie to w sprawozdaniu uzasadnione naukowo.

▼M8

Warunki utrzymywania i karmienia zwierząt

12. W przypadku gryzoni temperatura w pomieszczeniu dla zwierząt powinna wynosić 22 °C (±3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 40 % i pożądane jest, by nie przekraczała 70 % poza okresami czyszczenia pomieszczenia, najlepiej byłoby, gdyby utrzymywała się na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne z zachowaniem cyklu 12 godzin bez dostępu światła, które poprzedza 12 godzin z dostępem światła. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Wybór paszy może zależeć od potrzeby zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej, jeżeli jest ona podawana tą drogą. Przed poddaniem działaniu substancji lub przed kryciem gryzonie należy trzymać w małych grupach (nie więcej niż pięć sztuk) składających się ze zwierząt tej samej płci, jeżeli nie przewiduje się lub nie obserwuje agresywnego zachowania, a najlepiej trzymać je w klatkach z pełną podłogą oraz zapewnić im odpowiednie urozmaicenie warunków bytowania. Jeżeli ma to naukowe uzasadnienie, zwierzęta mogą być trzymane oddzielnie.

Przygotowanie zwierząt

13. Zdrowe i dojrzałe płciowo dorosłe samce i samice należy przydzielić losowo do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu badanej substancji. Zwierzęta znakuje się indywidualnie przy użyciu humanitarnej, mało inwazyjnej metody (np. poprzez obrączkowanie, kolczykowanie, wszczepianie mikroukładów i identyfikację biometryczną, a nie przycinanie uszu i palców) i aklimatyzuje do warunków laboratoryjnych przez co najmniej pięć dni. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Należy unikać zanieczyszczenia krzyżowego kontrolą dodatnią i badaną substancją chemiczną. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać ±20 % średniej masy dla każdej płci.

Przygotowanie dawek

14. Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuszczać lub przygotowywać w postaci zawiesiny w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach lub dodawać do paszy lub do wody do picia przed podaniem dawki zwierzętom. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym mogą być dawkowane bezpośrednio lub można je rozcieńczać przed dawkowaniem. W przypadku narażenia w drodze inhalacji badane substancje chemiczne można podawać w postaci gazu, pary lub stałych/ciekłych aerozoli, w zależności od ich właściwości fizykochemicznych. Należy stosować świeże preparaty badanej substancji chemicznej, chyba że z danych dotyczących stabilności wynika, iż przechowywanie tych preparatów jest dopuszczalne i że w danych tych określono warunki prawidłowego przechowywania takich preparatów.

Warunki badania

Rozpuszczalnik/nośnik

15. Rozpuszczalnik/nośnik w stosowanych objętościach dawek nie powinien wywoływać efektów toksycznych oraz nie powinno istnieć ryzyko, że wejdzie on w reakcję chemiczną z badaną substancją chemiczną. Jeśli stosowane są inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki, ich włączenie do doświadczenia powinno być poparte danymi referencyjnymi wskazującymi na ich zgodność. Zaleca się, aby, o ile to możliwe, w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników. Wśród przykładów powszechnie wykorzystywanych zgodnych rozpuszczalników/nośników można wymienić wodę, sól fizjologiczną, roztwór metylocelulozy, roztwór soli sodowej karboksymetylocelulozy, oliwę z oliwek i olej kukurydziany.

Kontrole dodatnie

16. Zawsze należy prowadzić równoległą grupę zwierząt na potrzeby kontroli dodatniej, chyba że laboratorium wykazało biegłość w przeprowadzaniu badania oraz w niedawnej przeszłości regularnie przeprowadzało takie badania (np. w ciągu ostatnich 5 lat). Nie ma jednak konieczności postępowania ze zwierzętami przeznaczonymi na potrzeby kontroli dodatniej w ten sam sposób jak ze zwierzętami otrzymującymi badaną substancję chemiczną, czy konieczności pobierania próbek we wszystkich odstępach czasu między okresami krycia. Substancjami stosowanymi do celów kontroli dodatniej powinny

▼M8

być substancje znane z wytwarzania dominującej mutacji letalnej w warunkach prowadzenia badania. Z wyjątkiem poddawania działaniu substancji badanej, ze zwierzętami w grupach kontrolnych należy obchodzić się w identyczny sposób jak ze zwierzętami w grupach poddanych działaniu substancji.

17. Dawki substancji stosowane do celów kontroli dodatniej należy dobrać w taki sposób, aby wywoływały słabe lub umiarkowane efekty, pozwalające na krytyczną ocenę efektywności i czułości badania, jednak wywołujące w sposób systematyczny efekty dodatnie dominującej mutacji letalnej. W tabeli 1 przedstawiono przykładowe substancje chemiczne stosowane do celów kontroli dodatniej oraz ich właściwe dawkowanie.

Tabela 1

Przykładowe substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej

Substancja [Nr CAS] (numer referencyjny)	Zakres dawki efektywnej (gatunek gryzonia)	Czas podawania (wyrażony w dniach)
Trietylenomelamina [51-18-3] (15)	0,25 (myszy)	1
Cyklofosfamid [50-18-0] (19)	50–150 (myszy)	5
Cyklofosfamid [50-18-0] (5)	25–100 (szczury)	1
Metanosulfonian etylu [62-50-0] (13)	100–300 (myszy)	5
Akrylamid monomeryczny [79-06-1] (17)	50 (myszy)	5
Chlorambucyl [305-03-3] (14)	25 (myszy)	1

Kontrole ujemne

18. W każdym okresie pobierania próbek należy uwzględnić zwierzęta przeznaczone do celów kontroli ujemnej, poddane działaniu samego rozpuszczalnika lub nośnika, a poza tym badane w ten sam sposób, jak grupy poddawane działaniu substancji (20). Jeżeli nie istnieją historyczne lub opublikowane dane wykazujące, że wybrany rozpuszczalnik/nośnik nie wywołuje żadnych dominujących mutacji letalnych ani innych szkodliwych skutków, zwierzęta w grupie kontrolnej powinny zostać również uwzględnione w każdym okresie pobierania próbek, aby ustalić dopuszczalność grupy kontrolnej nośnika.

PROCEDURA

Liczba zwierząt

19. Zaleca się krycie jednej dziewiczej samicy w sposób sekwencyjny w odpowiednio ustalonych z góry odstępach czasu (np. w tygodniowych odstępach czasu, pkt 21 i 23) przez pojedyncze samce. Liczbę samców w grupach należy ustalić z góry tak, aby zapewnić wystarczającą (w połączeniu z liczbą pokrytych samic w każdym okresie krycia) moc testów statystycznych niezbędną do wykrycia co najmniej dwukrotnego zwiększenia częstotliwości dominującej mutacji letalnej (pkt 44).

20. Należy również określić z góry liczbę samic w danym okresie krycia na podstawie obliczeń mocy testów statystycznych, aby zapewnić możliwość wykrycia co najmniej podwojenia częstości występowania dominującej mutacji letalnej (tj. liczba ciężarnych samic powinna być wystarczająca, aby uzyskać łącznie co najmniej 400 zagnieżdżonych zarodków) (20)(21)(22)(23), przy czym oczekuje się co najmniej jednego martwego zagnieżdżonego zarodka na jednostkę poddawaną analizie (tj. na grupę wykorzystywaną do krycia przy danej dawce) (24).

▼M8

Okres podawania i okresy krycia

21. Liczbę okresów krycia po poddaniu działaniu substancji ustala się na podstawie harmonogramu podawania substancji chemicznej, przy czym powinna ona zagwarantować, aby wszystkie etapy dojrzewania męskich komórek germinalnych zostały ocenione pod kątem indukcji dominującej mutacji letalnej (12)(25). W przypadku pojedynczego poddania działaniu substancji obejmującego podanie do pięciu dawek substancji w odstępach tygodniowych od ostatniego poddania działaniu substancji powinno odbyć się 8 kryć (w przypadku myszy) lub 10 kryć (w przypadku szczurów). W przypadku podania wielu dawek liczba okresów krycia może zostać zmniejszona proporcjonalnie do wydłużenia okresu podawania z zachowaniem celu polegającego na przeprowadzeniu oceny wszystkich etapów spermatogenezy (np. po 28-dniowym okresie narażenia ocena wszystkich etapów spermatogenezy u myszy wymaga zaledwie 4 kryć w tygodniu). Wszystkie harmonogramy podawania substancji chemicznej i harmonogramy krycia powinny być naukowo uzasadnione.

22. Samice powinny przebywać z samcami przez co najmniej jeden pełny cykl estrogenowy (np. jeden tydzień obejmuje jeden pełny cykl estrogenowy zarówno u myszy, jak i u szczurów). Samice, które nie zostały pokryte w tym jednotygodniowym okresie, mogą zostać wykorzystane w kolejnym okresie krycia. Ewentualnie samice mogą przebywać z samcami do momentu pokrycia, co ustala się poprzez sprawdzenie obecności plemników w pochwie lub obecności czopa pochwowego.

23. Okres narażenia i harmonogram krycia ustala się w zależności od nadrzędnego celu badania dominującej mutacji letalnej. Jeżeli celem jest ustalenie, czy dana substancja chemiczna sama w sobie wywołuje dominującą mutację letalną, uznawaną metodą byłoby poddanie całego cyklu spermatogenezy działaniu substancji (np. 7 tygodni u myszy, 5–7 przypadków poddania działaniu substancji w tygodniu) i przeprowadzenie jednorazowego krycia na zakończenie cyklu. Jeżeli jednak celem jest zidentyfikowanie wrażliwego rodzaju komórek germinalnych w kontekście indukcji dominującej mutacji letalnej, wówczas lepiej jest przeprowadzić jeden cykl narażenia lub poddawać działaniu substancji przez okres 5 dni, po którym zaleca się tygodniowy okres krycia.

Poziomy dawek

24. W przypadku przeprowadzania wstępnego badania ustalającego zakres dawkowania ze względu na brak dostępnych odpowiednich danych umożliwiających dobranie dawki, badanie takie należy wykonać w tym samym laboratorium z wykorzystaniem tego samego gatunku, szczepu, płci i schematu podawania substancji chemicznej, jakie mają być stosowane w badaniu głównym (26). Celem badania powinno być określenie maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) zdefiniowanej jako najwyższa dawka tolerowana bez wywoływania objawów toksyczności ograniczającej badanie w stosunku do czasu trwania badania (na przykład dawka wywołująca nietypowe zachowanie lub reakcje, niewielki spadek masy ciała lub cytotoksyczność układu krwiotwórczego), ale niepowodująca śmierci lub objawów bólu, cierpienia lub stresu, które wiązałyby się z koniecznością uśmiercenia zwierzęcia w humanitarny sposób (27)).

25. Maksymalna tolerowana dawka nie może również wywierać niekorzystnego wpływu na skuteczność krycia (21).

26. W przypadku badanych substancji chemicznych charakteryzujących się szczególną aktywnością biologiczną przy niskich dawkach nietoksycznych (takich jak hormony i mitogeny) oraz substancji chemicznych wykazujących intensywne parametry toksykokinetyczne dopuszcza się możliwość zastosowania odstępstwa od kryteriów ustalania dawek – każdą taką substancję należy oceniać indywidualnie.

27. Aby uzyskać informacje na temat zależności dawka-odpowiedź, w kompletnym badaniu należy uwzględnić grupę kontrolną ujemną oraz co najmniej trzy poziomy dawek, przy czym każda kolejna dawka jest większa od poprzedniej na ogół dwukrotnie, ale nie więcej niż czterokrotnie. Jeżeli wyniki badania ustalającego zakres dawkowania lub istniejące dane będą wskazywały, że badana substancja chemiczna nie wywołuje toksyczności, najwyższa dawka w przypadku podania jednorazowego powinna wynosić 2 000 mg/kg masy ciała. Jeżeli jednak badana substancja chemiczna będzie

▼M8

miała działanie toksyczne, maksymalną tolerowaną dawkę należy ustalić na poziomie odpowiadającym najwyższej podanej dawce, przy czym najlepiej byłoby, gdyby zastosowane poziomy dawek obejmowały zakres od dawki maksymalnej do dawki o niskiej toksyczności lub niewywołującej żadnej toksyczności. Jeżeli chodzi o nietoksyczne substancje chemiczne, dawka graniczna w przypadku okresu podawania trwającego 14 dni lub dłuższego wynosi 1 000 mg/kg masy ciała dziennie, a w przypadku okresu podawania trwającego krócej niż 14 dni – 2 000 mg/kg masy ciała dziennie.

Podawanie dawek

28. Planując test, należy wziąć pod uwagę przewidywaną drogę narażenia ludzi. W związku z tym można wybrać jako uzasadnione takie drogi narażenia, jak podanie substancji z paszą, z wodą do picia, podskórne, dożylne, przez wdychanie, ustne (przez sondę) lub przez implantację. W każdym razie drogę narażenia należy dobrać w taki sposób, aby zapewnić odpowiednie narażenie tkanek docelowych. Zasadniczo nie zaleca się dokonywania wstrzyknięć dootrzewnowych, ponieważ nie jest to typowa droga narażenia ludzi – taką drogę należy stosować wyłącznie w przypadku wystąpienia konkretnego uzasadnienia naukowego. Jeżeli badaną substancję chemiczną dodaje się do paszy lub wody do picia, w szczególności w przypadku pojedynczej dawki substancji, należy upewnić się, że okres między spożyciem paszy i wody a kryciem jest wystarczający, aby zapewnić możliwość wykrycia skutków podania substancji (pkt 31). Maksymalna objętość płynu, jaką można podać przez sondę lub wstrzyknąć jednorazowo, zależy od wielkości zwierzęcia doświadczalnego. Objętość ta nie powinna co do zasady przekraczać 1 ml/100 g masy ciała oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można zastosować maksymalnie 2 ml/100 g masy ciała. Zastosowanie objętości wyższych niż podane (jeżeli są dopuszczone przepisami dotyczącymi dobrostanu zwierząt) powinno być uzasadnione. Zmienność objętości badanej substancji należy zminimalizować, dostosowując stężenie, aby zapewnić stałą objętość w stosunku do masy ciała przy wszystkich poziomach dawek.

Obserwacje

29. Ogólne obserwacje kliniczne zwierząt doświadczalnych wraz z rejestrowaniem objawów klinicznych powinny odbywać się co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze i z uwzględnieniem szczytowego okresu przewidywanych skutków po dawkowaniu. Co najmniej dwa razy dziennie w trakcie okresu dawkowania wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane pod kątem zachorowalności i upadkowości. Wszystkie zwierzęta powinny być ważone na początku badania i co najmniej raz w tygodniu w trakcie badań dawki powtórzonej, a także w momencie ich uśmiercenia. Pomiary ilości spożytego pokarmu powinny być dokonywane co najmniej co tydzień. Jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie do picia, należy mierzyć spożycie wody przy każdej zmianie wody i co najmniej raz w tygodniu. Zwierzęta, u których stwierdzono oznaki podwyższonej toksyczności nieprowadzące do śmierci, należy uśmiercić przed zakończeniem okresu badania (27).

Pobieranie i przetwarzanie tkanek

30. Samice uśmierca się w drugiej połowie okresu ciąży, tj. w 13. dniu ciąży w przypadku myszy i w 14.–15. dniu ciąży w przypadku szczurów. Macice bada się pod kątem cech świadczących o dominującej mutacji letalnej, aby ustalić liczbę zagnieżdżonych zarodków, żywych i martwych embrionów oraz ciałek żółtych.

31. Rogi macicy i jajniki odsłania się w celu policzenia ciałek żółtych; płody są następnie usuwane, zliczane i ważone. Należy pamiętać o zbadaniu macic pod kątem resorbowanych jaj płodowych przesłoniętych żywymi płodami oraz o wyliczeniu wszystkich przypadków resorpcji. Należy odnotować upadkowość płodów. Odnotowuje się również liczbę skutecznie zapłodnionych samic oraz łączną liczbę implantacji, strat przedimplantacyjnych i upadkowości po implantacji (uwzględniając przypadki resorpcji na wczesnym i późnym etapie). Ponadto widoczne płody mogą zostać utrwalone w utrwalaczu Bouina na co najmniej 2 tygodnie; następnie

▼M8

bada się je pod kątem poważnych zewnętrznych wad rozwojowych (28), aby uzyskać dodatkowe informacje na temat wpływu badanego czynnika na rozrodczość i rozwój.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

32. Dane należy przedstawić w formie tabeli, wskazując liczbę samców, które pokryły samice, liczbę ciężarnych samic, oraz liczbę samic niebędących w ciąży. Wyniki krycia, w tym dane identyfikacyjne każdego samca i samicy, należy odnotować indywidualnie. W odniesieniu do każdej samicy należy wskazać okres krycia, poziom dawek, jakie podano samcom poddawanym działaniu substancji, oraz liczbę żywych i martwych zagnieżdżonych zarodków.

33. Straty poimplantacyjne oblicza się, ustalając stosunek martwych zagnieżdżonych zarodków do całkowitej liczby zagnieżdżonych zarodków w grupie poddawanej działaniu substancji i zestawiając ten stosunek ze stosunkiem martwych zagnieżdżonych zarodków do łącznej liczby zagnieżdżonych zarodków w danej grupie kontrolnej z nośnikiem/rozpuszczalnikiem.

34. Straty przedimplantacyjne oblicza się jako różnicę między liczbą ciałek żółtych a liczbą zagnieżdżonych zarodków lub jako spadek średniej liczby zagnieżdżonych zarodków na daną samicę w porównaniu z kryciami kontrolnymi. Jeżeli oszacowano straty przedimplantacyjne, należy zgłosić ten fakt.

35. Wartość wskaźnika dominującej mutacji letalnej szacuje się w następujący sposób: (upadki po implantacji / łączna liczba implantacji na samicę) × 100.

36. Należy zgłosić dane dotyczące toksyczności i objawów klinicznych (zgodnie z pkt 29).

Kryteria dopuszczalności

37. Dopuszczalność badania ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

— równoczesna kontrola ujemna jest zgodna z opublikowanymi normami dotyczącymi danych historycznych w zakresie kontroli ujemnych, a także – w stosownych przypadkach – z danymi historycznymi w zakresie kontroli zgromadzonymi przez dane laboratorium (zob. pkt 10 i 18);

— równoczesne kontrole dodatnie powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w opublikowanych normach dotyczących historycznych prób kontrolnych dodatnich lub reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej, jeżeli taka baza jest dostępna, i doprowadzić do statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 17 i 18);

— poddano analizie wystarczającą liczbę zagnieżdżonych zarodków i dawek (pkt 20);

— kryteria wyboru najwyższej dawki są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 24 i 27.

Ocena i interpretacja wyników

38. Aby uzyskać wystarczające dane do analizy zależności dawka-odpowiedź, należy przeanalizować co najmniej trzy poddane działaniu substancji grupy dawkowania.

▼M8

39. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik jednoznacznie dodatni, jeżeli:

— co najmniej jedna badana dawka wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,

— ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu pokazuje, że wzrost jest powiązany z dawką w co najmniej jednym z warunków doświadczalnych (np. tygodniowy odstęp między okresami krycia), oraz

— którykolwiek wynik znajduje się poza dopuszczalnym zakresem danych dotyczących kontroli ujemnej lub poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej gromadzonych przez dane laboratorium (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona), jeżeli takie dane są dostępne.

Od tego momentu badaną substancję chemiczną uznaje się za zdolną do wywołania dominujących mutacji letalnych w komórkach germinalnych zwierząt doświadczalnych. W pkt 44 opisano zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych; informacje na temat innych zalecanych podejść statystycznych można znaleźć również w literaturze (20)(21)(22)(24)(29). Jednostką doświadczalną w zastosowanych badaniach statystycznych powinno być zwierzę.

40. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik jednoznacznie ujemny, jeżeli:

— żadna dawka testowa nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,

— w ramach żadnego warunku doświadczalnego nie dochodzi do wzrostu powiązanego z dawką, oraz

— wszystkie wyniki mieszczą się w dopuszczalnym zakresie danych dotyczących kontroli ujemnych lub danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych gromadzonych przez dane laboratorium (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona), jeżeli takie dane są dostępne.

Od tego momentu badaną substancję chemiczną uznaje się za niezdolną do wywołania dominujących mutacji letalnych w komórkach germinalnych zwierząt doświadczalnych.

41. Weryfikacja jednoznacznie dodatniej lub jednoznacznie ujemnej reakcji nie jest wymagana.

42. Jeżeli reakcja nie jest ani jednoznacznie ujemna, ani jednoznacznie dodatnia oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku (np. niewielki lub graniczny wzrost), dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub wyniki dalszych badań przy wykorzystaniu istniejących danych doświadczalnych, takich jak dane wskazujące, czy wynik dodatni wykracza poza zakres danych dotyczących kontroli ujemnej lub poza zakres danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej gromadzonych przez dane laboratorium (30).

43. W rzadkich przypadkach, nawet po przeprowadzeniu dalszych badań, uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne i w takiej sytuacji wynik zostanie uznany za niejednoznaczny.

44. W badaniach statystycznych należy przyjąć, że jednostką doświadczalną jest zwierzę płci męskiej. Choć dane o liczbie (np. liczba zagnieżdżonych zarodków na samicę) mogą być rozłożone zgodnie z rozkładem Poissona lub odpowiednie dane dotyczące proporcji (np. odsetek martwych zagnieżdżonych zarodków) mogą być rozłożone zgodnie z rozkładem dwumianowym, takie dane są niejednokrotnie nadmiernie rozproszone (31). Dlatego też w ramach analizy statystycznej należy w pierwszej kolejności przeprowadzić badanie służące ustaleniu, czy w danym przypadku dochodzi do nadmiernego lub zbyt małego rozproszenia, takie jak test wariancji dwumianowej Cochrana (32) lub test Tarone'a C(α) w przypadku nadmiernego rozproszenia dwumianowego (31)(33). Jeżeli nie zostanie stwierdzone odstępstwo od rozproszenia dwumianowego, tendencje w zakresie proporcji przy poszczególnych poziomach dawek

▼M8

można zbadać, przeprowadzając test tendencji Cochrana-Armitage'a (34), przy czym przeprowadzane parami porównania z grupą kontrolną mogą zostać zbadane w ramach testu dokładnego Fishera (35). Podobnie w przypadku niestwierdzenia odstępstwa od rozproszenia dwumianowego tendencje w zakresie danych liczbowych można zbadać za pomocą regresji Poissona (36), przy czym przeprowadzane sparowane porównania z grupą kontrolną mogą zostać zbadane w kontekście modelu Poissona przy wykorzystaniu sparowanych kontrastów (36). W przypadku stwierdzenia znacznego nadmiernego lub zbyt małego rozproszenia zaleca się skorzystanie z metod nieparametrycznych (23)(31). Metody te obejmują bezparametrowe badanie statystyczne, takie jak test Jonckheere'a-Terpstry dla tendencji (37) i testy Manna-Whitneya (38) dla sparowanych porównań z grupą kontrolną z nośnikiem/rozpuszczalnikiem, a także testów permutacyjnych, testów, w ramach których dochodzi do ponownego wyboru próby, testów bootstrapowych dla tendencji oraz przeprowadzanych parami porównań z grupą kontrolną (31)(39).

45. Dodatni wynik testu dominującej mutacji letalnej dostarcza dowodów potwierdzających genotoksyczność badanej substancji chemicznej w odniesieniu do komórek germinalnych samca poddawanego działaniu substancji chemicznej, należącego do gatunku doświadczalnego.

46. Ustalenie, czy odnotowane wartości mieszczą się w zakresie danych historycznych dotyczących kontroli, czy też wykraczają poza ten zakres, może okazać się pomocne w kontekście oceny biologicznego znaczenia reakcji (40).

Sprawozdanie z badania

47. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Streszczenie.

Badana substancja chemiczna:

— źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli jest dostępny;

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;

— rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane;

— pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, stosownie do przypadku.

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej:

— uzasadnienie wyboru nośnika;

— rozpuszczalność oraz stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli są znane;

▼M8

— przygotowanie postaci użytkowych przeznaczonych do spożycia w paszy i z wodą do picia lub w formie wziewnej;

— oznaczenie analityczne postaci użytkowych (np. stabilność, jednorodność, stężenia nominalne), jeżeli jest przeprowadzane.

Zwierzęta doświadczalne:

— gatunek/szczep wykorzystywane w badaniu wraz z uzasadnieniem jego wyboru;

— liczba, wiek i płeć zwierząt;

— źródło pochodzenia, warunki utrzymywania, pasza itp.;

— metoda niepowtarzalnej identyfikacji zwierząt;

— w przypadku badań krótkoterminowych: masa ciała poszczególnych samców na początku i na końcu badania; w przypadku badań trwających dłużej niż jeden tydzień: masa ciała poszczególnych zwierząt w trakcie badania oraz informacje o spożyciu pokarmu. W odniesieniu do każdej grupy należy uwzględnić informacje o zakresie masy ciała oraz o średniej i odchyleniu standardowym.

Warunki badania:

— dane dotyczące kontroli dodatnich i ujemnych (z rozpuszczalnikiem/nośnikiem);

— dane uzyskane w ramach badania ustalającego zakres dawkowania;

— uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania;

— szczegółowe informacje dotyczące przygotowania badanej substancji chemicznej;

— szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej;

— uzasadnienie drogi podawania;

— metody pomiaru toksyczności u zwierząt, w tym dostępne analizy histopatologiczne lub hematologiczne oraz częstotliwość przeprowadzania obserwacji zwierząt i pomiaru masy ciała;

— metody sprawdzania, czy badana substancja chemiczna dotarła do tkanki docelowej lub do krwiobiegu w przypadku otrzymania wyników ujemnych;

— dawka faktyczna (mg/kg masy ciała na dobę) obliczona w oparciu o stężenie badanej substancji chemicznej w paszy/wodzie do picia (ppm) i spożycie, w stosownych przypadkach;

— szczegółowe informacje dotyczące jakości pokarmu i wody;

— szczegółowe informacje dotyczące urozmaicenia warunków bytowania w klatce;

— szczegółowy opis harmonogramów podawania substancji chemicznej i pobierania próbek oraz ich uzasadnienie;

— metoda analgezji;

— metoda uśmiercenia;

▼**M8**

— procedury izolowania i konserwacji tkanek;

— źródło i numery partii wszystkich zestawów i odczynników (w stosownych przypadkach);

— metody oznaczania liczby dominujących mutacji letalnych;

— harmonogram krycia;

— metody stosowane w celu ustalenia, czy nastąpiło krycie;

— czas uśmiercenia;

— kryteria oceny punktowej skutków dominującej mutacji letalnej, z uwzględnieniem ciałek żółtych, implantacji, resorpcji i strat przedimplantacyjnych, żywych zagnieżdżonych zarodków, martwych zagnieżdżonych zarodków.

Wyniki:

— stan zwierząt przed badaniem i podczas całego okresu badania, w tym oznaki toksyczności;

— masa ciała samca w okresie poddawania działaniu substancji i w okresie krycia;

— liczba pokrytych samic;

— w stosownych przypadkach zależność dawka-odpowiedź;

— dane dotyczące równoczesnych i historycznych kontroli ujemnych z uwzględnieniem zakresów, średnich i odchyleń standardowych;

— dane dotyczące równoczesnych kontroli dodatnich;

— dane zestawione w formie tabeli dla każdej z matek, w tym: liczba ciałek żółtych u danej matki; liczba implantacji u danej matki; liczba resorpcji i strat przedimplantacyjnych u danej matki; liczba żywych zagnieżdżonych zarodków u danej matki; liczba martwych zagnieżdżonych zarodków u danej matki; masy płodów;

— powyższe dane zestawione dla poszczególnych okresów krycia i dawek z uwzględnieniem częstości występowania dominujących mutacji letalnych;

— zastosowane analizy i metody statystyczne.

Omówienie wyników.

Wniosek.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2016). *Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015.* [W:] Publikacje na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny nr 234. Paryż: OECD.

(2) Bateman, A.J. (1977). *The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse*, [w:] B. J. Kilbey *et al.* (red.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures* s. 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. i Wiemann, H. (1978). *Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice.* Dokument sporządzony przez grupę roboczą utworzoną w ramach powołanej ad hoc komisji ds. genetyki chemicznej zajmującej się dominującymi mutacjami letalnymi. „Toxicol.”nr 39, s. 173–185.

▼**M8**

(4) Shelby M.D. (1996). *Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity*. „Mutation Res." nr 352, s. 159–167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. i 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 Research" nr 48, s. 267–270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. i Brinkworth, M.H. (1998). *A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene.* „Mutation Research" nr 397, s. 74–77.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. i Tarka, S.M. Jr. (1984). *Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats.* „*Toxicology* Lett." nr 20, s. 325–329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. i Miller, R.R. (1983). *Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats*. „Fundamental and Applied Toxicology" nr 3, s. 80–85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., i 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 Research" nr 33, s. 239–249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. i Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. „Biology of Reproduction" nr 70, s. 616–624.

(11) Marchetti F. i Wyrobek, A.J. (2005). *Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations.* „Birth Defects Research", nr C 75: 112–129

(12) Adler I.D. (1996). *Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans.* „Mutation Research" nr 352, s. 169–172.

(13) Favor J. i Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, „Mutation Research" nr 53, s. 21–27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. i Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. „Mutation Research" nr 345, s. 167–180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. i Gallo M.A. (1976). *The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine.* „Mutation Research" nr 40, s. 371–378.

(16) James D.A. i Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, „Mutation Research" nr 99 s. 303–314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. i Generoso, W.M. (1986). *Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice.* „Mutation Research" nr 173, s. 35–40.

▼**M8**

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. i Generoso W.M. (1992). *Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice.* „Mutation Research" nr 296, s. 143–156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. i Favor, J. (1993). *The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests*. Kirkland D.J. i Fox M. (red.), Cambridge: Cambridge University Press, s. 129–156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. i Hayashi, M. (1998). *Recommendations for Statistical Designs of* In Vivo *Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis.* „Mutation Research" nr 417 s. 19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. i Tanaka N. (1994). *International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests*. „Mutation Research" nr 312, s. 313-318.

(22) Generoso W.M. i Piegorsch W.W. (1993). *Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice.* „Methods in Toxicology", część 3A, s. 124–141.

(23) Haseman J.K. i Soares E.R. *The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects.* „Mutation Research" nr 41, s. 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. „Mutagenesis" nr 1, s. 353–360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S. i Purchase, I.F.H. (1981). *Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies.* „Mutation Research" nr 85, s. 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. i Richold, M. (1992). *Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in In Vivo Mutagenicity Assays.* „Mutagenesis" nr 7 s. 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,* [w:] *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 19), Paryż: Organisation for Economic Cooperation and Development.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J i Morphol J. (1969). *A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses*, nr. 127, s. 291–306.

(29) Kirkland D.J., (red.)(1989). *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data.* Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. i Thybaud V. (2011). *Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data.* „Mutation Research" nr 723, s. 87–90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. i Bishop J.B. (1992). *Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay.* „Mutation Research" nr 272, s. 35–58.

(32) Cochran W.G. (1954). *Some Methods for Strengthening the Common* χ^2 *Tests.* „Biometrics" nr 10, 417–451.

▼**M8**

(33) Tarone R.E. (1979). *Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution.* „Biometrika" nr 66, 585–590.

(34) Margolin B.H. (1988). *Test for Trend in Proportions.* [W:] Kotz S. and Johnson N. L. (red.) *Encyclopedia of Statistical Sciences.* t. 9, s. 334–336. John Wiley and Sons, Nowy Jork.

(35) D.R. Cox, *Analysis of Binary Data.* Chapman and Hall, Londyn (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. i Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models. wydanie czwarte, rozdziały 14 i 17, McGraw-Hill, Boston.

(37) Jonckheere R. (1954). *A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives.* „Biometrika" nr 41, s. 133–145.

(38) Conover W.J. (1971). *Practical Nonparametric Statistics.* John Wiley and Sons, Nowy Jork.

(39) Efron, B. (1982). *The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans.* Society for Industrial and Applied Mathematics, Filadelfia.

(40) Fleiss J. (1973). *Statistical Methods for Rates and Proportions.* John Wiley and Sons, Nowy Jork.

▼**M8**

Dodatek 1

DEFINICJE

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Ciałko żółte (ciałka żółte): hormonalna struktura wydzielnicza utworzona na jajniku w obszarze pęcherzyka, który uwolnił jajo. Liczba ciałek żółtych w jajnikach odpowiada liczbie jaj, u których nastąpił proces owulacji.

Dominująca mutacja letalna: mutacja, która zachodzi w komórce germinalnej lub utrwala się po zapłodnieniu, powodując śmierć embrionu lub stratę płodu.

Współczynnik płodności: liczba pokrytych ciężarnych samic w stosunku do liczby pokrytych samic.

Okres krycia: czas między zakończeniem fazy narażenia a kryciem przez samców poddanych działaniu substancji. Kontrolowanie tego okresu pozwala na ocenę wpływu efektów chemicznych na różne rodzaje komórek germinalnych. W przypadku krycia myszy w 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. i 8. tygodniu po zakończeniu narażenia mierzy się skutki, jakie zaszły w plemnikach, skondensowanych spermatydach, okrągłych spermatydach, spermatocytach na etapie pachytenu, wczesnych spermatocytach, zróżnicowanych spermatogoniach, spermatogoniach różnicujących oraz w spermatogoniach macierzystych.

Strata przedimplantacyjna: różnica między liczbą zagnieżdżonych zarodków a liczbą ciałek żółtych. Można ocenić przez porównanie całkowitej ilości zagnieżdżonych zarodków u danej samicy w grupie poddanej działaniu substancji i grupach kontrolnych.

Strata poimplantacyjna: odsetek martwych zagnieżdżonych zarodków w grupie poddanej działaniu substancji porównany ze stosunkiem liczby martwych zagnieżdżonych zarodków do ich całkowitej liczby w grupie kontrolnej.

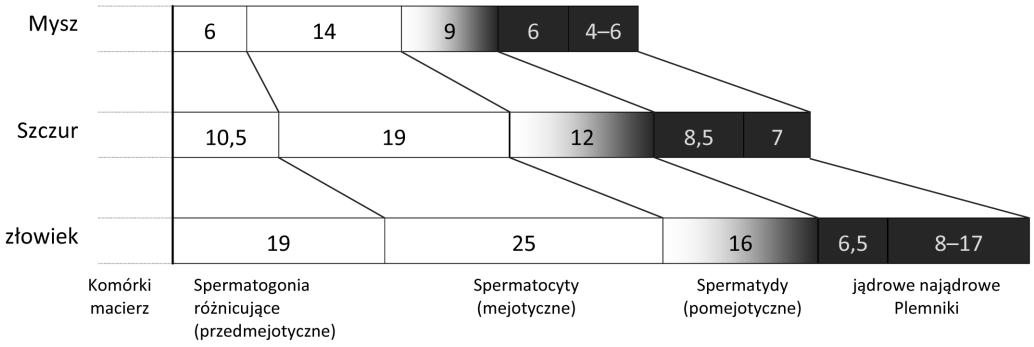
Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

▼**M8**

Dodatek 2

HARMONOGRAM SPERMATOGENEZY U SSAKÓW



Rysunek. 1. Porównanie czasu trwania (w dniach) rozwoju męskiej komórki germinalnej u myszy i człowieka. Naprawa DNA nie następuje w okresach wskazanych przez zacienienie.

Powyższy schemat przedstawia przebieg spermatogenezy u myszy, szczurów i człowieka (źródło: „Alder" 1996). Do spermatogoniów niezróżnicowanych zalicza się: spermatogonia *A single* (As); spermatogonia A *paired* (Ap); oraz spermatogonia A *aligned* (Aal) (źródło: Hess and de Franca, 2008). Spermatogonia A *single* uznaje się za rzeczywiste komórki macierzyste; w związku z tym, aby móc przeprowadzić ocenę wpływu na komórki macierzyste, między ostatnim wstrzyknięciem badanej substancji chemicznej a kryciem musi upłynąć co najmniej 49 dni (w przypadku myszy).

Źródła

Adler, ID (1996). *Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans*. „Mutation Research" nr 352, s. 169–172.

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

▼M8

B.23. BADANIE ABERRACJI CHROMOSOMOWEJ SPERMATOGONIÓW U SSAKÓW

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 483 (2016). Metody badawcze są okresowo poddawane przeglądowi w związku z postępem naukowym, zmieniającymi się potrzebami regulacyjnymi oraz troską o dobrostan zwierząt. Niniejsza zmodyfikowana wersja metody badawczej odzwierciedla wieloletnie doświadczenie w przeprowadzaniu tego badania oraz potencjał integracji lub łączenia tego badania z innymi badaniami dotyczącymi toksyczności lub genotoksyczności. Łączenie badań toksyczności stwarza możliwość ograniczenia liczby zwierząt wykorzystywanych w badaniach toksyczności. Niniejsza metoda badawcza stanowi część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. OECD opracowała dokument, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd najnowszych zmian, jakie wprowadzono do wytycznych OECD dotyczących badań w zakresie toksykologii genetycznej (1).

2. Celem badania aberracji chromosomowej spermatogoniów u ssaków *in vivo* jest zidentyfikowanie substancji chemicznych, które powodują strukturalne aberracje chromosomowe w spermatogoniach ssaków (2)(3)(4). Ponadto niniejsze badanie jest istotne dla oceny genotoksyczności, ponieważ czynniki związane z metabolizmem, farmakokinetyką oraz procesami naprawy DNA *in vivo* – choć mogą różnić się w zależności od gatunku – są aktywne i wywierają wpływ na reakcję. Niniejsza metoda badawcza nie służy do pomiaru aberracji liczbowych; testu tego nie stosuje się rutynowo w tym celu.

3. Za pomocą niniejszego badania mierzy się strukturalne aberracje chromosomowe (zarówno w typie chromosomowym, jak i chromatydowym) w dzieleniu komórek germinalnych i w związku z tym oczekuje się, że pozwoli ono prognozować wprowadzanie dziedzicznych mutacji w komórkach germinalnych.

4. Definicje kluczowych terminów podano w dodatku.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

5. Chociaż niniejsze badanie przeprowadza się zazwyczaj na gryzoniach, w niektórych przypadkach dopuszcza się również możliwość wykorzystania innych gatunków, jeżeli zostanie to naukowo uzasadnione. Standardowe preparaty cytogenetyczne jąder gryzoni umożliwiają wygenerowanie metafaz mitotycznych (spermatogoniów) oraz mejotycznych (spermatocytów). Metafazy mitotyczne oraz mejotyczne można zidentyfikować, opierając się na morfologii chromosomów (4). Niniejsze badanie cytogenetyczne *in vivo* umożliwia wykrywanie strukturalnych aberracji chromosomowych podczas podziału mitotycznego spermatogonii. Inne komórki docelowe nie są przedmiotem niniejszej metody badawczej.

6. Aby wykryć aberracje typu chromatydowego w spermatogoniach przed przekształceniem tych aberracji w aberracje typu chromosomowego w kolejnych podziałach komórek, należy zbadać pierwszy podział komórki mitotycznej następujący po poddaniu działaniu substancji. Dodatkowe informacje ze spermatocytów poddanych działaniu substancji można uzyskać w drodze analizy chromosomu mejotycznego pod kątem strukturalnych aberracji chromosomowych w diakinezie metafazy I i metafazie II.

▼M8

7. W jądrze występuje pewna liczba generacji spermatogoniów (5) i te różne rodzaje komórek germialnych mogą charakteryzować się pewnym zakresem wrażliwości na działanie substancji chemicznej. Zatem wykryte aberracje przedstawiają zagregowaną reakcję poddanych działaniu substancji populacji spermatogoniów. Spermatogonia B stanową większość komórek mitotycznych w preparatach z jądrem, a ich cykl komórkowy wynosi około 26 godzin (3).

8. Jeżeli istnieją dowody świadczące o tym, że badana substancja chemiczna lub jej metabolit lub metabolity nie dotrą do jądra, nie należy przeprowadzać tego badania.

ZASADA METODY BADAWCZEJ

9. Zasadniczo zwierzęta poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej z zastosowaniem odpowiedniej drogi narażenia i uśmierca się je po upływie odpowiedniego czasu od podania substancji chemicznej. Przed uśmierceniem zwierzętom podaje się substancję chemiczną zawierającą środek zatrzymujący metafazę (np. kolchicynę lub Colcemid®). Następnie z komórek germinalnych sporządza się preparaty chromosomowe i je barwi, po czym analizuje się komórki metafazy pod kątem aberracji chromosomowych.

WERYFIKACJA BIEGŁOŚCI LABORATORIUM

10. Kompetencje w zakresie przedmiotowego testu ustala się, wykazując zdolność do odtwarzania częstotliwości oczekiwanych wyników strukturalnej aberracji chromosomowej w spermatogoniach z substancjami służącymi do kontroli dodatniej (łącznie z reakcjami słabymi), takimi jak te wymienione w tabeli 1, oraz uzyskując częstotliwości kontroli ujemnej spójne z zakresem danych dotyczących kontroli dopuszczalnym w dostępnej literaturze (np. (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) lub z historycznym rozkładem kontroli laboratorium, jeżeli jest dostępny.

OPIS METODY

Czynności przygotowawcze

Wybór gatunku zwierząt

11. Badania należy prowadzać na zdrowych młodych dorosłych zwierzętach należących do szczepów powszechnie wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych. Zazwyczaj wykorzystuje się samce myszy; jeżeli zostanie to naukowo uzasadnione, dopuszcza się jednak możliwość wykorzystania innych odpowiednich gatunków ssaków, dopuszcza się także przeprowadzenie niniejszego badania w połączeniu z inną metodą badawczą. W sprawozdaniu należy przedstawić naukowe uzasadnienie wykorzystania gatunków innych niż gryzonie.

Warunki utrzymywania i karmienia zwierząt

12. W przypadku gryzoni temperatura w pomieszczeniu dla zwierząt powinna wynosić 22 °C (±3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 40 % i pożądane jest, by nie przekraczała 70 % poza okresami czyszczenia pomieszczenia, najlepiej byłoby, gdyby utrzymywała się na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne w cyklu 12 godzin z dostępem światła i 12 godzin bez dostępu światła. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Wybór paszy może zależeć od potrzeby zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej, jeżeli jest ona podawana tą drogą. Gryzonie należy trzymać w małych grupach (nie więcej niż pięć zwierząt w klatce), jeżeli nie przewiduje się ich agresywnego zachowania, najlepiej w klatkach z pełną podłogą, oraz zapewnić im odpowiednie urozmaicenie warunków bytowania. Jeżeli ma to naukowe uzasadnienie, zwierzęta mogą być trzymane oddzielnie.

▼M8

Przygotowanie zwierząt

13. Zazwyczaj wykorzystuje się zdrowe młode dorosłe samce (w wieku 8–12 tygodni na początku badania) i losowo przydziela do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu substancji. Zwierzęta znakuje się indywidualnie przy użyciu humanitarnej, mało inwazyjnej metody (np. poprzez obrączkowanie, kolczykowanie, wszczepianie mikroukładów i identyfikację biometryczną, a nie przycinanie uszu lub palców) i aklimatyzuje do warunków laboratoryjnych przez co najmniej pięć dni. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Należy unikać zanieczyszczenia krzyżowego kontrolą dodatnią i badaną substancją chemiczną. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała poszczególnych zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać ±20 %.

Przygotowanie dawek

14. Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuszczać lub przygotowywać w postaci zawiesiny w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach lub dodawać do paszy lub do wody do picia przed podaniem dawki zwierzętom. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym mogą być dawkowane bezpośrednio lub można je rozcieńczać przed dawkowaniem. W przypadku narażenia w drodze inhalacji badane substancje chemiczne można podawać w postaci gazu, pary lub stałych/ciekłych aerozoli, w zależności od ich właściwości fizykochemicznych. Należy stosować świeże preparaty badanej substancji chemicznej, chyba że z danych dotyczących stabilności wynika, iż przechowywanie tych preparatów jest dopuszczalne i że w danych tych określono warunki prawidłowego przechowywania takich preparatów.

Warunki badania – rozpuszczalnik/nośnik

15. Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien wywoływać efektów toksycznych przy stosowanych poziomach dawek oraz nie powinien być w stanie wchodzić w reakcję chemiczną z badanymi substancjami chemicznymi. Jeśli stosowane są inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki, ich włączenie do doświadczenia powinno być poparte danymi referencyjnymi wskazującymi na ich zgodność. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników. Wśród przykładów powszechnie wykorzystywanych zgodnych rozpuszczalników/nośników można wymienić wodę, sól fizjologiczną, roztwór metylocelulozy, roztwór soli sodowej karboksymetylocelulozy, oliwę z oliwek i olej kukurydziany. Jeżeli nie istnieją historyczne lub opublikowane dane wykazujące, że wybrany nietypowy rozpuszczalnik/nośnik nie wywołuje żadnych strukturalnych aberracji chromosomowych ani innych szkodliwych skutków, należy wykonać badanie wstępne w celu ustalenia dopuszczalności stosowania kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem.

Kontrole dodatnie

16. Zawsze należy prowadzić równoległą grupę zwierząt na potrzeby kontroli dodatniej, chyba że laboratorium wykazało biegłość w przeprowadzaniu badania oraz w niedawnej przeszłości regularnie przeprowadzało takie badania (np. w ciągu ostatnich 5 lat). W przypadku nieuwzględnienia równoczesnej kontroli dodatniej, do każdego doświadczenia należy włączyć kontrolę na potrzeby oceny ilościowej (utrwalone i niebarwione preparaty). Tego rodzaju kontrole można uzyskać, włączając do oceny ilościowej wyników badania odpowiednie próbki referencyjne, które pozyskano w trakcie odrębnego doświadczenia przeprowadzanego okresowo (np. co 6–18 miesięcy) z wykorzystaniem kontroli dodatniej, i które są przechowywane w laboratorium przeprowadzającym test; na przykład w trakcie badania biegłości i – w stosownych przypadkach – w regularnych odstępach czasu w późniejszym okresie.

17. Substancje służące do kontroli dodatniej powinny w przewidywalny sposób generować zauważalny wzrost częstości występowania komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi w porównaniu z częstością występowania samorzutnego. Dawki stosowane do celów kontroli dodatniej należy dobierać w taki sposób, aby efekty były jasne, lecz aby osoba zliczająca nie była w stanie natychmiast zidentyfikować zakodowanych próbek. W tabeli 1 przedstawiono przykładowe substancje służące do kontroli dodatniej.

▼M8

Tabela 1

Przykładowe substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej

Substancje [nr CAS] (numer referencyjny)
Cyklofosfamid (monohydrat) [nr CAS 50-18-0 (nr CAS 6055-19-2)] (9)
Cykloheksyloamina [nr CAS 108-91-8] (7)
Mitomycyna C [nr CAS 50-07-7] (6)
Akrylamid monomeryczny [CAS 79-06-1] (10)
Trietylenomelamina [CAS 51-18-3] (8)

Kontrole ujemne

18. W każdym okresie pobierania próbek należy uwzględnić zwierzęta przeznaczone do celów kontroli ujemnej, poddane działaniu samego rozpuszczalnika lub nośnika, a poza tym badane w ten sam sposób, jak grupy poddawane działaniu substancji. Jeżeli nie istnieją historyczne lub opublikowane dane wykazujące, że wybrany rozpuszczalnik/nośnik nie wywołuje żadnych aberracji chromosomowych lub innych szkodliwych skutków, zwierzęta w grupie kontrolnej powinny zostać również uwzględnione w każdym okresie pobierania próbek w celu ustalenia dopuszczalności grupy kontrolnej nośnika.

PROCEDURA

Liczba zwierząt

19. Na początku badania należy ustalić liczebność grup w celu zapewnienia w każdej grupie co najmniej 5 samców. Uważa się, że ta liczba zwierząt w grupie jest wystarczająca, aby zapewnić odpowiednią moc testów statystycznych (tj. ogólnie umożliwiającą wykrycie co najmniej podwojenia częstości występowania aberracji chromosomowych, kiedy poziom kontroli ujemnej wynosi co najmniej 1,0 %, a prawdopodobieństwo poziomu istotności wynoszącego 0,05 jest równe 80 %) (3)(11). Zgodnie z maksymalnymi typowymi wymaganiami w zakresie liczby zwierząt – w przypadku badania, w ramach którego dwukrotnie pobiera się próbki, z trzema grupami dawkowania i równolegle prowadzoną kontrolą ujemną oraz dodatnią (każda grupa złożona z pięciu zwierząt), wymagane byłoby użycie 45 zwierząt.

Harmonogram podawania substancji chemicznej

20. Badane substancje chemiczne zazwyczaj podaje się jednorazowo (tj. jako pojedynczą dawkę); można również zastosować inne schematy dawkowania, pod warunkiem że są one naukowo uzasadnione.

21. W grupie otrzymującej najwyższą dawkę wykorzystywane są dwa okresy pobierania próbek po poddaniu działaniu substancji badanej. Ponieważ czas wymagany na wchłonięcie i metabolizm badanych substancji chemicznych oraz jego oddziaływanie na kinetykę cyklu komórkowego mogą wywierać wpływ na optymalny czas na wykrycie aberracji chromosomowej, wykorzystuje się wcześniejszy i późniejszy okres pobierania próbek – po upływie 24 godzin oraz po upływie 48 godzin po poddaniu działaniu substancji badanej. W przypadku dawek innych niż najwyższa należy wykorzystać wczesny okres pobierania próbek – po 24 godzinach (czas równy czasowi trwania cyklu komórkowego spermatogoniów B lub krótszy i tym samym optymalizujący prawdopodobieństwo oceny pierwszych metafaz po poddaniu działaniu substancji), chyba że znany jest inny, bardziej odpowiedni i uzasadniony okres pobierania próbek.

22. Można stosować inne okresy pobierania próbek. Na przykład w przypadku substancji chemicznych, które mogą wywierać skutki niezależne od fazy S, odpowiednie mogą być wcześniejsze okresy pobierania próbek (tj. krótsze niż 24 godziny).

▼M8

23. Można wykorzystać schemat powtórzonej dawki substancji chemicznej, np. w połączeniu z badaniem w innym punkcie końcowym, w którym stosuje się okres podawania wynoszący 28 dni (np. metoda badawcza B.58); aby uwzględnić różne okresy pobierania próbek, będą jednak wymagane dodatkowe grupy zwierząt. W związku z powyższym odpowiedniość takiego schematu należy uzasadnić naukowo w poszczególnych przypadkach.

24. Przed uśmierceniem zwierzętom wstrzykuje się dootrzewnowo odpowiednią dawkę substancji chemicznej zatrzymującej metafazę (np. Colcemid® lub kolchicyna). Następnie pobiera się próbkę ze zwierząt w odpowiednim odstępie czasu. W przypadku myszy i szczurów ten odstęp czasu wynosi około 3–5 godzin.

Poziomy dawek

25. W przypadku przeprowadzenia wstępnego badania ustalającego zakres dawkowania ze względu na brak dostępnych odpowiednich danych umożliwiających dobranie dawki, badanie takie należy wykonać w tym samym laboratorium z wykorzystaniem tego samego gatunku, szczepu i schematu podawania substancji chemicznej, jakie mają być stosowane w badaniu głównym według zaleceń dotyczących prowadzenia badań ustalających zakres dawkowania (12). Celem badania powinno być określenie maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) zdefiniowanej jako dawka powodująca niewielkie efekty toksyczne w stosunku do czasu trwania badania (na przykład nietypowe zachowanie lub reakcje, niewielki spadek masy ciała lub cytotoksyczność układu krwiotwórczego), ale niepowodująca śmierci lub objawów bólu, cierpienia albo stresu, które wiązałyby się z koniecznością uśmiercenia zwierząt (13).

26. Najwyższa dawka może być również określona jako dawka wywołująca niektóre objawy toksyczności w spermatogoniach (np. zmniejszenie wskaźnika podziału mitotycznego spermatogonii w odniesieniu do pierwszej oraz drugiej metafazy podziału mejotycznego). Redukcja ta nie powinna przekroczyć 50 %.

27. W przypadku badanych substancji chemicznych charakteryzujących się szczególną aktywnością biologiczną przy niskich dawkach nietoksycznych (takich jak hormony i mitogeny) oraz substancji chemicznych wykazujących intensywne parametry toksykokinetyczne dopuszcza się możliwość zastosowania odstępstwa od kryteriów ustalania dawek – każdą taką substancję należy oceniać indywidualnie.

28. Aby uzyskać informacje na temat zależności dawka-odpowiedź, w kompletnym badaniu należy uwzględnić grupę kontrolną ujemną (pkt 18) oraz co najmniej trzy poziomy dawek, przy czym każda kolejna dawka jest większa od poprzedniej na ogół dwukrotnie, ale nie więcej niż czterokrotnie. Jeżeli wyniki badania ustalającego zakres dawkowania lub istniejące dane będą wskazywały, że badana substancja chemiczna nie wywołuje toksyczności, najwyższa dawka w przypadku podania jednorazowego powinna wynosić 2 000 mg/kg masy ciała. Jeżeli jednak badana substancja chemiczna będzie miała działanie toksyczne, maksymalną tolerowaną dawkę należy ustalić na poziomie odpowiadającym najwyższej podanej dawce, przy czym najlepiej byłoby, gdyby zastosowane poziomy dawek obejmowały zakres od dawki maksymalnej do dawki o niskiej toksyczności lub niewywołującej żadnej toksyczności. W przypadku zaobserwowania toksyczności w tkance docelowej (tj. w jądrze) przy wszystkich badanych poziomach dawek zaleca się dalsze badania z wykorzystaniem dawek nietoksycznych. W przypadku badań przeprowadzanych w celu uzyskania bardziej szczegółowych ilościowych informacji na temat zależności dawka-odpowiedź konieczne może okazać się utworzenie dodatkowych grup dawkowania. Wspomniane wartości graniczne mogą różnić się w przypadku niektórych rodzajów badanych substancji chemicznych (np. produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi), które podlegają szczególnym wymogom. Jeżeli badana substancja chemiczna wywołuje toksyczność, należy wybrać dawkę graniczną i dwie niższe dawki (jak opisano powyżej). Dawka graniczna w przypadku okresu podawania trwającego 14 dni lub dłuższego wynosi 1 000 mg/kg masy ciała dziennie, a w przypadku okresu podawania trwającego krócej niż 14 dni – 2 000 mg/kg masy ciała dziennie.

▼M8

Podawanie dawek

29. Planując test, należy wziąć pod uwagę przewidywaną drogę narażenia ludzi. W związku z tym można wybrać jako uzasadnione takie drogi narażenia, jak podanie substancji z paszą, z wodą do picia, miejscowe, podskórne, dożylne, ustne (przez sondę), przez wdychanie lub przez implantację. Drogę narażenia należy w każdym razie dobrać w taki sposób, aby zapewnić odpowiednie narażenie tkanki docelowej. Zasadniczo nie zaleca się dokonywania wstrzyknięć dootrzewnowych, o ile nie jest to naukowo uzasadnione, ponieważ nie jest to zazwyczaj droga narażenia ludzi pod względem fizjologicznym. Jeżeli badaną substancję chemiczną dodaje się do paszy lub wody do picia, w szczególności w przypadku pojedynczej dawki substancji, należy upewnić się, że okres między spożyciem paszy i wody a pobraniem próbki jest wystarczający, aby zapewnić możliwość wykrycia skutków podania substancji (zob. pkt 33). Maksymalna objętość płynu, jaką można podać przez sondę lub wstrzyknąć jednorazowo, zależy od wielkości zwierzęcia doświadczalnego. Objętość ta nie powinna co do zasady przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można zastosować maksymalnie 2 ml/100 g masy ciała. Zastosowanie objętości wyższych niż podane (jeżeli są dopuszczone przepisami dotyczącymi dobrostanu zwierząt) powinno być uzasadnione. Zmienność objętości badanej substancji należy zminimalizować, dostosowując stężenie, aby zapewnić stałą objętość w stosunku do masy ciała przy wszystkich poziomach dawek.

Obserwacje

30. Ogólne obserwacje kliniczne zwierząt doświadczalnych wraz z rejestrowaniem objawów klinicznych powinny odbywać się co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze i z uwzględnieniem szczytowego okresu przewidywanych skutków po dawkowaniu. Co najmniej dwa razy dziennie wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane pod kątem zachorowalności i upadkowości. Wszystkie zwierzęta powinny być ważone na początku badania, co najmniej raz w tygodniu w trakcie badań z dawką powtórzoną oraz po uśmierceniu. W przypadku badań trwających co najmniej tydzień co najmniej raz w tygodniu należy dokonywać pomiaru ilości spożytego pokarmu. Jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie do picia, należy mierzyć spożycie wody przy każdej zmianie wody i co najmniej raz w tygodniu. Zwierzęta, u których stwierdzono oznaki podwyższonej toksyczności nieprowadzące do śmierci, należy uśmiercić przed zakończeniem okresu badania (13).

Przygotowanie chromosomów

31. Natychmiast po uśmierceniu pozyskuje się zawiesiny komórek germinalnych z jednego jądra lub z obu jąder, poddaje działaniu roztworu hipotonicznego i utrwala zgodnie z ustalonymi protokołami (np. (2)(14)(15)). Komórki umieszcza się następnie na szkiełkach mikroskopowych i barwi (16)(17). Wszystkie szkiełka mikroskopowe należy zakodować, aby osoba zliczająca nie mogła ich zidentyfikować.

Analiza

32. W przypadku każdego zwierzęcia należy ocenić co najmniej 200 prawidłowo rozmieszczonych metafaz (3)(11). Jeżeli historyczna częstość kontroli ujemnych jest < 1 %, w przypadku każdego zwierzęcia należy ocenić ponad 200 komórek, aby zwiększyć moc testów statystycznych (3). Należy zastosować metody barwienia, które umożliwiają identyfikację centromeru.

33. Aberracje typu chromosomowego i chromatydowego należy odnotowywać oddzielnie i klasyfikować według podtypów (pęknięcia, wymiany). Przy ustalaniu, czy substancja chemiczna powoduje znaczący wzrost występowania komórek z aberracjami chromosomowymi, należy odnotować przerwy bez ich uwzględniania. Procedury stosowane w laboratorium powinny zapewniać przeprowadzanie analizy aberracji chromosomowych przez odpowiednio przeszkolonych pracowników dokonujących oceny

▼M8

punktowej. Z uwagi na fakt, iż w wyniku przygotowywania preparatów często dochodzi do złamań w części komórek w metafazie, co prowadzi do utraty chromosomów, komórki poddawane ocenie punktowej powinny zawierać liczbę centromerów wynoszącą co najmniej 2n±2, gdzie n stanowi haploidalną liczbę chromosomów dla danego gatunku.

34. Mimo że celem badania jest wykrycie strukturalnych aberracji chromosomowych, należy pamiętać o konieczności odnotowywania częstości występowania komórek poliploidalnych i komórek z endoreduplikowanymi chromosomami, jeżeli zaobserwowano wystąpienie tych zjawisk (zob. pkt 44).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

35. Dane dotyczące poszczególnych zwierząt należy przedstawić w postaci tabeli. W przypadku każdego zwierzęcia należy ocenić liczbę komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi oraz liczbę aberracji chromosomowych na komórkę. Aberracje typu chromosomowego i chromatydowego sklasyfikowane według podtypów (pęknięcia, wymiany) należy wyszczególnić oddzielnie, podając ich liczbę i częstość występowania w grupach doświadczalnych i kontrolnych. Przerwy odnotowuje się osobno. Częstość występowania przerw zgłasza się, lecz zazwyczaj nie uwzględnia się ich w analizie ogólnej częstości występowania strukturalnych aberracji chromosomowych. Odsetek poliploidalności oraz komórek z endoreduplikowanymi chromosomami zgłasza się, jeżeli zostaną one zaobserwowane.

36. Należy zgłosić dane dotyczące toksyczności i objawów klinicznych (zgodnie z pkt 30).

Kryteria dopuszczalności

37. Dopuszczalność badania ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

— równoczesna kontrola ujemna jest zgodna opublikowanymi normami dotyczącymi danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych, co do których oczkuje się, że odsetek komórek z aberracjami chromosomowymi będzie > 0 % i ≤ 1,5 %, a także – w stosownych przypadkach – zgodnie z danymi historycznymi dotyczącymi kontroli zgromadzonymi przez dane laboratorium (zob. pkt 10 i 18);

— równoczesne kontrole dodatnie powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w opublikowanych normach dotyczących historycznych prób kontrolnych dodatnich lub reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej, jeżeli taka baza jest dostępna, i doprowadzić do statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 17, 18);

— poddano analizie wystarczające liczby komórek i dawek (zob. pkt 28 i 32);

— kryteria wyboru najwyższej dawki są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 25 i 26.

38. Jeżeli obserwuje się zarówno mitozę, jak i mejozę, powinien zostać oznaczony wskaźnik podziału mitotycznego spermatogonii w odniesieniu do pierwszej i drugiej metafazy podziału mejotycznego, jako miara cytotoksyczności dla wszystkich zwierząt poddanych działaniu substancji oraz poddanych kontroli ujemnej w całkowitej próbie 100 dzielących się komórek na zwierzę. Jeżeli obserwuje się jedynie mitozę, indeks mitotyczny powinien zostać oznaczony w co najmniej 1 000 komórek w odniesieniu do każdego zwierzęcia.

Ocena i interpretacja wyników

39. Aby uzyskać wystarczające dane do analizy zależności dawka-odpowiedź, należy przeanalizować co najmniej trzy poddane działaniu substancji grupy dawkowania.

▼M8

40. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik jednoznacznie dodatni, jeżeli:

— co najmniej jedna badana dawka wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,

— wzrost jest powiązany z dawką w co najmniej jednym okresie pobierania próbek; oraz

— którykolwiek wynik znajduje się poza dopuszczalnym zakresem danych dotyczących kontroli ujemnej lub poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej gromadzonych przez dane laboratorium (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona), jeżeli takie dane są dostępne.

Od tego momentu badaną substancję chemiczną uznaje się za zdolną do wywołania aberracji chromosomowych w spermatogoniach zwierząt doświadczalnych. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można również znaleźć w literaturze (11)(18). Jednostką doświadczalną w zastosowanych badaniach statystycznych powinno być zwierzę.

41. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik jednoznacznie ujemny, jeżeli:

— żadna dawka testowa nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,

— w ramach żadnego warunku doświadczalnego nie dochodzi do wzrostu powiązanego z dawką, oraz

— wszystkie wyniki mieszczą się w dopuszczalnym zakresie danych dotyczących kontroli ujemnych lub danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych gromadzonych przez dane laboratorium (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona), jeżeli takie dane są dostępne.

Od tego momentu badaną substancję chemiczną uznaje się za niezdolną do wywołania aberracji chromosomowych w spermatogoniach zwierząt doświadczalnych. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można również znaleźć w literaturze (11)(18). Wynik ujemny nie wyklucza możliwości, że dana substancja chemiczna może wywoływać aberracje chromosomowe lub mutacje genowe w późniejszych fazach rozwojowych, których nie zbadano.

42. Weryfikacja wyraźnie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

43. Jeżeli reakcja nie jest ani jednoznacznie ujemna, ani jednoznacznie dodatnia oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku (np. niewielki lub graniczny wzrost), dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub wyniki dalszych badań przy wykorzystaniu istniejących danych doświadczalnych, takich jak dane wskazujące, czy wynik dodatni wykracza poza zakres danych dotyczących kontroli ujemnej lub poza zakres danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej gromadzonych przez dane laboratorium (19).

44. W rzadkich przypadkach, nawet po przeprowadzeniu dalszych badań, uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne i w takiej sytuacji wynik zostanie uznany za niejednoznaczny.

45. Wzrost liczby komórek poliploidalnych może świadczyć o tym, że badana substancja chemiczna może potencjalnie hamować procesy mitotyczne oraz powodować aberracje liczby chromosomów (20). Wzrost liczby komórek z endoreduplikowanymi chromosomami może świadczyć o tym, że badana substancja chemiczna może potencjalnie hamować przebieg cyklu komórkowego (21)(22), który jest innym mechanizmem wywoływania ilościowych zmian chromosomowych niż hamowanie procesów mitotycznych (zob. pkt 2). W związku z tym częstość występowania komórek poliploidalnych i komórek z endoreduplikowanymi chromosomami należy odnotować oddzielnie.

▼M8

Sprawozdanie z badania

46. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Streszczenie.

Badana substancja chemiczna:

— źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli jest dostępny;

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;

— rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane;

— pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, stosownie do przypadku.

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej:

— uzasadnienie wyboru nośnika;

— rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku.

— przygotowanie postaci użytkowych przeznaczonych do spożycia w paszy i z wodą do picia lub w formie wziewnej;

— oznaczenia analityczne postaci użytkowych (np. stabilność, jednorodność, stężenia nominalne), jeżeli są przeprowadzane.

Zwierzęta doświadczalne:

— gatunek/szczep wykorzystywane w badaniu wraz z uzasadnieniem jego zastosowania;

— liczba oraz wiek zwierząt;

— źródło pochodzenia, warunki utrzymywania, pasza itp.;

— metoda niepowtarzalnej identyfikacji zwierząt;

— w przypadku badań krótkoterminowych: masa ciała poszczególnych zwierząt na początku i na końcu badania; w przypadku badań trwających dłużej niż jeden tydzień: masa ciała poszczególnych zwierząt w trakcie badania oraz informacje o spożyciu pokarmu. W odniesieniu do każdej grupy należy uwzględnić informacje o zakresie masy ciała oraz o średniej i odchyleniu standardowym.

Warunki badania:

— dane dotyczące kontroli dodatnich i ujemnych (z rozpuszczalnikiem/nośnikiem);

▼**M8**

— dane dotyczące studium określającego zakres badania, jeżeli zostało przeprowadzone;

— uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania;

— uzasadnienie drogi podawania;

— szczegółowe informacje dotyczące przygotowania badanej substancji chemicznej;

— szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej;

— uzasadnienie czasu uśmiercenia;

— metody pomiaru toksyczności u zwierząt, w tym dostępne analizy histopatologiczne lub hematologiczne oraz częstotliwość przeprowadzania obserwacji zwierząt i pomiaru masy ciała;

— metody sprawdzania, czy badana substancja chemiczna dotarła do tkanki docelowej lub do krwiobiegu w przypadku otrzymania wyników ujemnych;

— dawka faktyczna (mg/kg masy ciała na dobę) obliczona w oparciu o stężenie badanej substancji chemicznej w paszy/wodzie do picia (ppm) i spożycie, w stosownych przypadkach;

— szczegółowe informacje dotyczące jakości pokarmu i wody;

— szczegółowy opis harmonogramów podawania substancji chemicznej i pobierania próbek oraz ich uzasadnienie;

— metoda uśmiercenia;

— metoda analgezji (jeżeli jest stosowana);

— procedury izolowania tkanek;

— nazwa substancji chemicznej zatrzymującej metafazę, jej stężenie oraz czas poddania działaniu substancji;

— metody przygotowywania preparatów;

— kryteria oceny aberracji;

— liczba poddanych analizie komórek przypadających na zwierzę;

— kryteria uznawania badań za pozytywne, ujemne lub niejednoznaczne.

Wyniki:

— stan zwierząt przed badaniem i podczas całego okresu badania, w tym oznaki toksyczności;

— masa ciała i organów po uśmierceniu (jeżeli zastosowano wielokrotne poddanie działaniu substancji chemicznej, pomiar masy ciała przeprowadza się w trakcie danego schematu dawkowania);

— oznaki toksyczności;

— indeks mitotyczny;

— wskaźnik podziału mitotycznego spermatogonii w odniesieniu do pierwszej i drugiej metafazy podziału mejotycznego lub inne dowody świadczące o narażeniu na tkankę docelową;

— rodzaj i liczba aberracji podawane osobno dla każdego zwierzęcia;

— łączna liczba aberracji na grupę wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi;

▼**M8**

— liczba komórek z aberracjami na grupę wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi;

— w stosownych przypadkach zależność dawka-odpowiedź;

— zastosowane analizy i metody statystyczne;

— dane dotyczące równoczesnych kontroli ujemnych;

— dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej wraz z zakresami, średnimi, odchyleniami standardowymi i przedziałem ufności o wartości 95 % (w stosownych przypadkach) lub opublikowane dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej wykorzystywane do akceptacji wyników badania;

— dane dotyczące równoczesnych kontroli dodatnich;

— zmiany ploidalności, jeżeli zostały zaobserwowane, w tym informacje na temat częstości występowania poliploidalności lub komórek endoreduplikowanych.

Omówienie wyników

Wniosek

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2016). *Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015.* [W:] Publikacje na temat środowiska, Seria dotycząca badań i oceny, nr 234, OECD, Paryż.

(2) Adler, I.-D. (1984). *Cytogenetic Tests in Mammals*, [W:] *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, red. S. Venitt i J.M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, s. 275–306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. i Tanaka N. (1994). *International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests*. „Mutation Research" nr 312, s. 313–318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo Cytogenetics: Mammalian Germ Cells*. „Mutation Research" nr 455, s. 167–189.

(5) Hess, R.A. i de Franca L.R. (2008). *Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium* [W:] *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, (red.) Cheng C.Y, Landes Biosciences and Springer Science+Business Media, s. 1–15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C. „Mutation Research" nr 23(3): s. 368–379. Adler, I.D. (1986). *Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications*, [W:] *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, (red.) Ramel C., Lambert B. i Magnusson J., Liss, New York, s. 477–484.

(7) Cattanach, B.M., i Pollard C.E. (1971). *Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse*. „Mutation Research", nr 12, 472–474.

(8) Cattanach, B.M. i Williams, C.E. (1971). *A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens*. „Mutation Research", nr 13, 371–375.

(9) Rathenburg, R. (1975). *Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia*. „Humangenetik", nr 29, 135–140.

▼**M8**

(10) Shiraishi, Y. (1978). *Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice*. „Mutation Research", nr 57(3), s. 313–324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. i Hayashi, M. (1998). *Recommendations for Statistical Designs of* In Vivo *Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis.* „Mutation Research" nr 417 s. 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. i Richold, M. (1992). *Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in* In Vivo *Mutagenicity Assays.* „Mutagenesis", nr 7, s. 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", nr 19, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paryż.

(14) Yamamoto, K. i Kikuchi, Y. (1978). *A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes*. „Mutation Research", nr 52, 207–209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. i Pathak, S. (1979). *Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations*. „Environ. Mutagen.", nr 1, s. 291–294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., i Ford, C.E. (1964). *An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes*. „Cytogenetics and Cell Genetics" nr 3, 289–294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. i Henderson, L. (1990). In Vivo *Cytogenetics Assays*, [w:] (red.) D.J. Kirkland, *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, s. 115–141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.i Savage, J.R.K. (1989). „Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays", [w:] (red.) D.J. Kirkland, *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, s. 184–232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. i Thybaud, V. (2011). *Compilation and use of genetic toxicity historical control Data*. „Mutation Research" nr 723, s. 87–90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. i 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 Research" nr 287, s. 29–46.

(21) Huang, Y., Change, C. i Trosko, J.E. (1983). *Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells*. „Cancer Res." nr 43, s. 1362–1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). *Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest.* „Mutation Research" nr 119, s. 403–413.

▼M8

Dodatek

DEFINICJE

Aneuploidia: wszelkie odchylenia od zwykłej diploidalnej (lub haploidalnej) liczby chromosomów w pojedynczym chromosomie lub w większej ich liczbie, ale nie w całym zestawie lub w całych zestawach chromosomów (poliploidalność).

Centromer: region(y) chromosomu, w którym(-ch) mikrotubule wrzeciona podziałowego są asocjowane w trakcie podziału komórki, co umożliwia przemieszczenie się chromosomów potomnych do biegunów komórek potomnych.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Różnorodność chromosomów: różnorodność kształtów chromosomów (np. metacentryczne, akrocentryczne itd.) i ich rozmiarów.

Aberracja typu chromatydowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu wyrażone jako złamanie pojedynczych chromatyd lub złamanie i ponowne połączenie się chromatyd.

Aberracja typu chromosomowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu wyrażone jako złamanie chromatyd lub złamanie i ponowne połączenie się obu chromatyd w tym samym miejscu.

Klastogen: każda substancja chemiczna, która powoduje strukturalne aberracje chromosomowe w populacjach komórek lub organizmów.

Przerwa: achromatyczne uszkodzenie mniejsze niż szerokość jednej chromatydy prowadzące do minimalnego wypaczenia chromatyd.

Genotoksyczny: ogólny termin obejmujący wszelkiego rodzaju uszkodzenia DNA lub chromosomu, w tym pęknięcia, delecje, addukty, modyfikacje i sprzężenia nukleotydów, rearanżacje, mutacje, aberracje chromosomowe oraz aneuploidie. Nie wszystkie rodzaje skutków genotoksycznych powodują mutacje lub stałe uszkodzenia chromosomu.

Indeks mitotyczny: stosunek komórek w metafazie do całkowitej liczby komórek zaobserwowanych w populacji komórek; wskazanie stopnia proliferacji tej populacji.

Mitoza: podział jądra komórkowego zazwyczaj podzielony na profazę, prometafazę, metafazę, anafazę i telofazę.

Mutagenny: powoduje dziedziczne zmiany w sekwencji lub sekwencjach par zasad DNA w genach lub w strukturze chromosomów (aberracje chromosomowe).

Aberracja liczbowa: zmiana liczby chromosomów względem standardowej liczby chromosomów typowej dla wykorzystywanych zwierząt.

Poliploidalność: wielokrotność haploidalnej liczby chromosomów (n) inna niż liczba diploidalna (tj. 3*n*, 4*n* itd.).

Strukturalna aberracja chromosomowa: zmiana w strukturze chromosomu wykrywalna przez badanie mikroskopowe etapu metafazy w cyklu podziału komórki, zaobserwowana jako delecje, fragmenty i wymiany.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UVCB: substancje chemiczne o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji i materiały biologiczne;

▼M7

_____

▼B

B.25. TRANSLOKACJA DZIEDZICZNOŚCI U MYSZY

1. **METODA**

1.1. WSTĘP

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

1.2. DEFINICJE

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Badanie translokacji dziedziczności u myszy wykrywa strukturalne i ilościowe zmiany chromosomowe w komórkach zarodkowych ssaków, zregenerowane w pierwszym pokoleniu potomstwa. Typy wykrytych zmian chromosomowych to obustronne translokacje oraz, jeżeli włącza się potomstwo płci żeńskiej, utrata chromosomu X. Nośniki translokacji i samice o genotypie XO wykazują zmniejszoną płodność, która jest używana do wyboru potomstwa F_1 do celów analizy cytogenetycznej. Całkowita bezpłodność jest spowodowana przez pewne typy translokacji (chromosom X-autosom i typu c-t). Translokacje są obserwowane w komórkach mejotycznych w diakinezie metafazy I u osobników męskich, również F_1, samców lub męskiego potomstwa samic F_1. Samice o genotypie XO są identyfikowane cytogenetycznie dzięki obecności tylko 39 chromosomów w komórkach szpiku kostnego przechodzących mitozę.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

Brak.

1.6. OPIS METODY BADAWCZEJ

Przygotowania

Substancje testowe rozpuszczane są w izotonicznym roztworze soli. Substancje chemiczne nierozpuszczalne w wodzie są rozpuszczane lub zawieszane we właściwych nośnikach. Należy zastosować świeże roztwory testowego związku chemicznego. Zastosowany nośnik nie powinien kolidować z testową substancją chemiczną ani powodować jakichkolwiek objawów toksyczności.

Drogi podawania substancji

Zwyczajowe drogi podawania substancji to intubacja drogą pokarmową lub iniekcja dootrzewnowa. Inne drogi podawania substancji testowej mogą być również właściwe.

Zwierzęta badane

W celu ułatwienia hodowli i cytologicznej weryfikacji niniejsze badania przeprowadzane są na myszach. Nie jest wymagany szczególny szczep myszy. Jednakże średni rozmiar miotu powinien być większy niż osiem osobników i powinien być stosunkowo stały.

Należy wykorzystać zdrowe, dojrzałe płciowo zwierzęta.

▼B

Liczba zwierząt

Wymagana liczba zwierząt zależy od częstotliwości samorzutnej translokacji oraz minimalnego stopnia wywoływania objawów, w celu uzyskania wyniku pozytywnego.

Badanie zazwyczaj przeprowadzane jest przez analizę potomstwa samców F_1. Należy poddać badaniu co najmniej 500 samców potomstwa F_1 w danej grupie dawkowania. W przypadku włączenia samic potomstwa F_1 wymagane jest 300 samców i 300 samic.

Użycie negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych

Powinny zostać udostępnione odpowiednie dane uzyskane z równoległych i bazowych grup kontrolnych. W przypadku dostępności wyników pozytywnej grupy kontrolnej, uzyskanych w z badań ostatnio przeprowadzanych w tym samym laboratorium, wyniki te można zastosować zamiast równoległej pozytywnej grupy kontrolnej.

Poziomy dawek

Badany jest jeden poziom dawki, zazwyczaj najwyższy poziom dawki związany jest z produkcją minimalnych objawów toksyczności, ale nie ma wpływu na zachowania związane z rozrodczością lub przeżyciem osobników. W celu ustalenia zależności między poziomem dawki a reakcją wymagane jest zastosowanie dwóch dodatkowych poziomów dawek. W przypadku nietoksycznych substancji chemicznych należy zastosować ekspozycję na najmniejszy stosowany poziom dawki.

Procedura

Poddanie działaniu substancji testowej oraz krycie

Wymagane są dwa harmonogramy podawania substancji. Najszerzej stosowane jest jednorazowe podanie substancji testowej. Stosować można również podawanie substancji testowej siedem dni w tygodniu przez okres 35 dni. Liczba kryć po zakończeniu podawania substancji regulowana jest harmonogramem badań w celu zapewnienia uzyskania próbek z wszystkich faz komórki zarodkowej. Po zakończeniu okresu krycia samice należy umieścić w pojedynczych klatkach. W przypadku porodu samic należy odnotować datę, wielkość miotu oraz płeć potomstwa. Całe potomstwo zawierające osobniki samców jest odzwyczajane od ssania, a potomstwo zawierające samice jest odrzucane, chyba że jest włączone do badania.

Badanie translokacji heterozygotyczności

Stosowana jest jedna z dwóch możliwych metod:

— badanie płodności potomstwa F_1 i późniejsza weryfikacja ewentualnych nośników translokacji przez przeprowadzenie analiz cytogenicznych,

— analizy cytogenetyczne całego męskiego potomstwa F_1 bez wcześniejszej selekcji przez badanie płodności.

a) Badanie płodności

Zmniejszona płodność osobnika F_1 może być stwierdzona na podstawie obserwacji rozmiarów potomstwa i/lub analizy zawartości macic samic.

Należy określić kryteria dla ustalania normalnej i obniżonej płodności wykorzystanego szczepu myszy.

▼B

Obserwacje wielkości miotu: samce F_1 przeznaczone do badania umieszczane są w klatkach pojedynczo z samicami zarówno z tego samego badania, jak i z koloni. Klatki kontroluje się codziennie, zaczynając od 18 dnia po kryciu. Wielkość miotu oraz płeć potomstwa F_2 odnotowane są po urodzeniu, a następnie mioty są odrzucane. W przypadku badania potomstwa żeńskiego F_1 potomstwo F_2 małych miotów jest zachowywane w celu przeprowadzenia dalszych badań. Żeńskie nośniki translokacji są weryfikowane za pomocą analiz translokacji u ich męskiego potomstwa. Samice XO są rozpoznawane przez zmianę wskaźnika płci u ich potomstwa wynoszącego od 1:1 do 1:2 osobników samczych do samic. W procedurze sekwencyjnej normalne zwierzęta F_1 są eliminowane z dalszych badań, jeżeli pierwszy miot F_2 osiągnął lub przekroczył wcześniej ustaloną wartość; w przeciwnym razie obserwacjom poddawany jest drugi lub trzeci miot F_2.

Zwierzęta F_1, których nie można zaklasyfikować jako normalne po zakończeniu obserwacji trzech miotów F_2, zostają poddane dalszemu badaniu przez analizę zawartości macicznych albo bezpośrednio poddawane analizom cytogenetycznym.

Analiza zawartości macicznej: Redukcja rozmiaru miotu z nośnikami translokacji spowodowana jest śmiercią zarodkową, tak że wysoka liczba martwych implantów jest przejawem obecności translokacji u badanych zwierząt. Samce F_1, mające być poddane badaniu, wykorzystywane są do krycia dwóch lub trzech samic każdy. Poczęcie ustalane jest przez codzienną poranną kontrolę czopu nasienia w pochwie. Samice uśmiercane są 14–16 dni później a żywe lub martwe implanty w ich macicach są odnotowywane.

b) Analiza cytogeniczna

Preparaty z jąder przygotowywane są techniką suszenia powietrzem. Nośniki translokacji rozpoznawane są przez obecność wielowartościowych konfiguracji w diakinezie metafazy I w podstawowych spermatocytach. Obserwacja co najmniej dwóch komórek z wielowartościowymi związkami stanowi wymagane dowody na potwierdzenie faktu, iż zwierzę posiada nośnik translokacji.

Wszystkie samce F_1 należy zbadać cytogenetycznie, jeżeli nie została przeprowadzona żadna selekcja podczas rozmnażania. Należy mikroskopowo oznaczyć minimum 25 komórek diakinezy metafazy I danego samca. Analiza metafaz mitotycznych w spermatogoniach bądź szpiku kostnym jest wymagana u samców F_1 z małymi jądrami i defektem mejozy przed diakinezą lub z samic F_1 z podejrzeniem genotypu XO. Obecność niezwykle długiego i/lub krótkiego chromosomu w każdej z 10 komórek jest dowodem na szczególną męską translokację prowadzącą do niepłodności (typ c-t). Niektóre translokacje chromosom X-autosom, które powodują męską niepłodność mogą być zidentyfikowane tylko na podstawie analizy pasmowej chromosomów mitotycznych. Obecność 39 chromosomów we wszystkich 10 mitozach jest dowodem na istnienie XO u samicy.

2. **DANE**

Dane należy przedstawić w formie tabeli.

W każdym okresie krycia należy odnotować średni rozmiar miotu oraz stosunek płci w potomstwie pochodzącym z rodzicielskiej pary przy urodzeniu i w okresie odzwyczajania od ssania.

▼B

Dla oszacowania płodności zwierząt F_1 przedstawiane są średnie wielkości potomstwa pochodzącego z normalnego krycia oraz ilość żyjących i nieżywych implantów z każdego krycia osobników F_1, gdzie odnotowano występowanie nośników translokacji. W celu dokonania analizy zawartości macicznej należy odnotować średnią liczbę żywych i martwych implantów potomstwa pochodzącego z normalnego krycia oraz poszczególne liczby żyjących i martwych implantów dla każdego potomstwa gdzie odnotowano występowanie nośników translokacji.

Aby dokonać analizy cytogenetycznej diakinezy metafazy I, ilość typów wielowartościowych konfiguracji oraz całkowita liczba parzeń i czasu trwania krycia są odnotowywane.

W odniesieniu do bezpłodnych osobników F_1 należy odnotować ogólną liczbę kryć oraz czas trwania okresu krycia. Należy podać wagę jąder oraz szczegóły wyników analizy cytogenetycznej.

W odniesieniu do samic XO odnotowana jest średnia wielkość miotu, stosunek płci potomstwa F_2 oraz wyniki analizy cytogenetycznej.

Jeżeli możliwe, potomstwo F_1 z nośnikami translokacji poddawane jest wcześniejszej selekcji przez badania płodności, tabele muszą zawierać informację, ile z nich zostało potwierdzonych jako translokacje heterozygotyczne.

Należy odnotować dane z badań negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych.

3. **SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— szczep myszy, wiek zwierząt, waga badanych zwierząt,

— liczba rodzicielskich zwierząt każdej płci w grupie badanej i grupach kontrolnych,

— warunki badania, szczegółowy opis badania, wielkości dawkowania, rozpuszczalniki, harmonogram krycia,

— liczba i płeć potomstwa danej samicy, liczba i płeć potomstwa hodowanego do analizy translokacji,

— czas i kryteria analizy translokacyjnej,

— liczba oraz szczegółowy opis nośników translokacji, włączając dane dotyczące rozmnażania i dane dotyczące zawartości macicznej, w odpowiednich przypadkach,

— procedury cytogenetyczne i szczegóły analizy mikroskopowej, najlepiej wraz ze zdjęciami,

— statystyczna analiza,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

▼B

3.2. ANALIZA I INTERPRETACJA

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

4. **ODNIESIENIA**

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

▼B

B.26. **BADANIE TOKSYCZNOŚCI PODPRZEWLEKŁEJ DROGĄ POKARMOWĄ – STUDIUM TOKSYCZNOŚCI NA GRYZONIACH METODĄ POWTARZANEJ 90-DNIOWEJ DAWKI DROGĄ POKARMOWĄ**

1. **METODA**

Niniejsza metoda badania toksyczności podprzewlekłej drogą pokarmową jest kopią OECD TG 408 (1998).

1.1. WPROWADZENIE

Przy oszacowaniu i ocenie cech toksyczności substancji chemicznej oznaczenie podprzewlekłej toksyczności drogą pokarmową, stosując powtarzane dawki, jest prowadzone po początkowej informacji o toksyczności, uzyskanej z 28-dniowych badań toksyczności ostrej lub powtarzanej. 90-dniowe badanie dostarcza informacji o możliwym niebezpieczeństwie dla zdrowia, które prawdopodobnie powstanie z powtarzanego narażenia w ciągu przedłużonego okresu czasu, obejmującego moment odstawienia od piersi, poprzez rozwój do dojrzałości. Badanie dostarczy informacji na temat głównych toksycznych działań, wskaże zaatakowane organy i możliwości akumulacji, dostarczy oceny poziomu ekspozycji na badania niepowodującego negatywnych skutków, którą stosuje się przy wyborze poziomów dawki dla badań przewlekłych i ustalania kryteriów bezpieczeństwa dla narażenia ludzi.

Metoda kładzie dodatkowy nacisk na aspekt neurologiczny i wskazuje oddziaływania na układ immunologiczny i rozrodczy. Potrzeba starannej klinicznej obserwacji zwierząt, aby uzyskać tak wiele informacji, jak to możliwe, jest również stresująca. Niniejsze badanie powinno umożliwić określenie substancji chemicznych, które mogą potencjalnie powodować działania neurotoksyczne, immunologiczne lub wpływać na organy rozrodcze oraz uzasadniające dalsze dogłębne ich zbadanie.

Zob. także Wprowadzenie ogólne część B.

1.2. DEFINICJE

Dawka: jest ilością podawanej substancji badanej. Dawka jest wyrażana wagowo (g, mg) lub jako waga substancji badanej na jednostkę wagi badanego zwierzęcia (np. mg/kg), lub jako stężenie stałe żywieniowe (ppm).

Dawkowanie: jest ogólnym pojęciem obejmującym dawkę, jej częstotliwość i czas podawania dawki.

NOAEL: jest skrótem od poziomu, przy którym nie obserwuje się niekorzystnych skutków, oraz jest najwyższym poziomem dawki, gdzie nie obserwuje się niekorzystnych efektów zależnych od podawanej substancji.

1.3. ZASADA METODY BADANIA

Badana substancja jest codziennie podawana doustnie w stopniowanych dawkach kilku grupom zwierząt doświadczalnych, jeden poziom dawki na grupę przez okres 90 dni. W czasie okresu podawania zwierzęta są ściśle obserwowane w zakresie oznak zatrucia. Zwierzęta, które zmarły lub zostały zabite w czasie trwania badania, są poddawane sekcji zwłok, po zakończeniu badania zwierzęta, które przeżyły, są również zabijane i poddawane sekcji zwłok.

▼B

1.4. OPIS METODY BADANIA

1.4.1. **Przygotowanie zwierząt**

Muszą zostać użyte zdrowe zwierzęta, zaaklimatyzowane w warunkach laboratoryjnych przez przynajmniej pięć dni i niebędące przedmiotem wcześniejszych procedur eksperymentalnych. Zwierzęta badane muszą charakteryzować się gatunkiem, szczepem, źródłem, płcią, wagą i/lub wiekiem. Zwierzęta muszą być losowo wyznaczane do doświadczeń kontrolnych i grup traktowanych. Klatki muszą być rozmieszczone w taki sposób, aby możliwy wpływ wynikający z ich przemieszczenia był minimalny. Każde zwierzę musi być oznakowane niepowtarzalnym numerem identyfikacyjnym.

1.4.2. **Przygotowanie dawek**

Substancja badana jest podawana przez zgłębnik lub w postaci pokarmu lub wody pitnej. Metoda podawania drogą pokarmową jest zależna od celu badania oraz właściwości fizycznych/chemicznych badanego materiału.

Tam gdzie jest to konieczne, badaną substancje rozpuszcza się lub wykonuje zawiesinę w odpowiednim nośniku. Zalecane jest, aby tam gdzie to jest możliwe, rozważyć wpierw użycie roztworu lub zawiesiny wodnej, a następnie rozważyć wykonanie roztworu/zawiesiny w oleju (np. w oleju kukurydzianym) i dopiero następnie w innych nośnikach. Dla nośników różnych od wody muszą być znane cechy toksyczności. Powinna być określona stabilność badanej substancji w warunkach podawania dawek.

1.4.3. **Warunki badania**

1.4.3.1. *Zwierzęta eksperymentalne*

Zalecanym gatunkiem jest szczur, ale także inne gatunki gryzoni, np. mysz. Powinny być wykorzystane zwykłe stosowane laboratoryjne szczepy zdrowych dorosłych zwierząt. Samice muszą być zeroroczne, nieciężarne. Dozowanie musi rozpocząć się tak szybko, jak to możliwe po odłączeniu od matki, a w każdym przypadku przed osiągnięciem wieku dziewięciu tygodni. Przy rozpoczęciu badań, zmiany wagi wykorzystanych zwierząt muszą być minimalne i nie przekraczać ± 20 % średniej wagi w każdej płci. W przypadku gdy badania są prowadzone jako wstępne do badań toksyczności przewlekłej długoterminowej, do obu badań należy wykorzystać zwierzęta tego samego szczepu i źródła.

1.4.3.2. *Ilość i płeć*

Co najmniej 20 zwierząt (10 samic i 10 samców) należy wykorzystać w odniesieniu do każdego poziomu dawki. Jeśli planuje się zabijanie pośrednie, liczba musi być zwiększona o przewidzianą ilość zwierząt do zabicia przed zakończeniem badań. W oparciu o wcześniejszą wiedzę o substancjach chemicznych i bliskich odpowiednikach należy rozważyć włączenie dodatkowej satelickiej grupy 10 zwierząt (po 5 każdej płci) do grupy kontrolnej i grupy najwyżej dawkowanej, do celów obserwacji, po okresie traktowania, odwracalności lub trwałości jakichkolwiek skutków toksycznych. Czas trwania tego okresu po zakończeniu traktowania powinien być ustalony odpowiednio w odniesieniu do obserwowanych skutków.

▼B

1.4.3.3. *Poziomy dawek*

Stosuje się co najmniej trzy poziomy dawek i równoczesne doświadczenie kontrolne, poza przypadkiem, gdy prowadzone jest badanie graniczne (zob. 1.4.3.4). Poziomy dawek mogą być oparte na wynikach powtarzanej dawki lub badaniach ustalania zakres oraz powinny uwzględniać wszelkie istniejące dane toksykologiczne i toksykokinetyczne, dostępne w odniesieniu do badanej substancji lub związanych z nią materiałów. Poza ograniczeniami natury fizykochemicznej i działaniami biologicznymi substancji badanej, poziom najwyższej dawki musi być wybrany w celu wzbudzenia objawów toksycznych, ale nie spowodowania śmierci czy też poważnych cierpień. Opadająca sekwencja poziomu dawki musi być wybrana w celu pokazania reakcji związanej z dawkowaniem i poziomem, przy którym nie obserwuje się negatywnych skutków (NOAEL) przy najniższym poziomie dawki. Dwa do czterech zachodzące przedziały są często optymalne do ustalenia opadających poziomów dawki i dodanie czwartej grupy badanej jest często polecane dla zastosowania bardzo dużych odstępów (np. więcej niż współczynnik 6–10) między dawkowaniami.

Grupa kontrolna musi być grupą nietraktowaną lub grupą kontrolną nośnika, jeśli nośnik jest używany do podawania substancji badanej. Zwierzęta w grupie kontrolnej, poza nietraktowaniem jej substancją badaną, są obsługiwane w identyczny sposób jak w zwierzęta w grupach badanych. Jeśli stosowany jest nośnik, grupa kontrolna musi otrzymywać nośnik w maksymalnie stosowanej objętości. Gdy substancja badana jest podawana w diecie i powoduje zmniejszenie zapotrzebowania żywieniowego, wtedy grupa kontrolna z pary żywieniowej może być pomocna w rozróżnieniu między zmniejszeniem spowodowanym smacznością lub zmianami toksykologicznymi w modelu badania.

Następujące cechy nośnika i innych dodatków muszą być rozważone jako właściwe: wpływ wchłaniania, rozkładu, metabolizmu, retencji badanej substancji, wpływ właściwości chemicznych substancji badanej, mogące zmienić jej cechy toksyczności oraz wpływy zapotrzebowania na żywność i wodę lub żywieniowy status zwierząt.

1.4.3.4. *Badanie graniczne*

Jeśli badanie przy jednym poziomie dawki, równoważnym co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała/dzień, stosując procedurę opisaną w odniesieniu do niniejszego badania, powoduje, że nie obserwuje się negatywnych skutków oraz jeśli nie oczekuje się toksyczności na podstawie danych substancji strukturalnie związanych, wtedy pełne badania z zastosowaniem trzech poziomów nie wydają się konieczne. Badanie graniczne ma zastosowanie, z wyjątkiem sytuacji, gdy narażenie ludzi wskazuje potrzebę zastosowania wyższego poziomu dawki.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Podawanie dawek**

Zwierzętom dozuje się substancję badaną przez siedem dni każdego tygodnia w okresie 90 dni. Każdy inny sposób dozowania, na przykład pięć dni w tygodniu, wymaga uzasadnienia. Gdy substancja badana jest podawana przez zgłębnik, musi być to wykonane w pojedynczej dawce, przy użyciu sondy przełykowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Maksymalna objętość cieczy, która może być podana w jednym momencie, zależy od rozmiarów zwierzęcia badanego. Objętość nie może przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, poza przypadkiem wodnych roztworów, gdzie można zastosować 2 ml/100 g masy ciała. Z wyjątkiem substancji drażniących i żrących, które zwykle ujawniają silniejsze działanie przy wyższym stężeniu, zmienności w objętości badanej muszą być zminimalizowane przez ustawienie stężenia tak, aby zapewnić stałą objętość we wszystkich poziomach dozowania.

▼B

W odniesieniu do substancji podawanych w pokarmie lub wodzie pitnej istotne jest zapewnienie, aby ilości danej substancji badanej nie kolidowały z normalnym odżywianiem lub równowagą wodną. Gdy substancja badana jest podawana w pokarmie – w stałym stężeniu w pokarmie (ppm) albo w stałym poziomie dawki – może być zastosowana w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia; wykorzystana alternatywa musi być określona. W odniesieniu do substancji podawanej przez zgłębnik dawka musi być podana w podobnej porze każdego dnia i regulowana tak, by utrzymać stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia. W przypadku gdy badanie 90-dniowe jest stosowane jako wstępne do badań długoterminowych toksyczności przewlekłej, w obu badaniach powinien być użyty podobny pokarm.

1.5.2. **Obserwacje**

Okres obserwacji powinien wynosić przynajmniej 90 dni. Zwierzęta w grupie satelickiej, zaplanowanej do dalszej obserwacji, muszą być trzymane przez stosowny okres bez traktowania w celu wykrycia wytrzymałości na lub powrotu do normy od działań toksycznych.

Ogólne kliniczne obserwacje powinny być dokonywane przynajmniej raz na dzień, najlepiej o tej (tych) samej(-ych) porze (porach) każdego dnia, uwzględniając szczytowy okres przewidywanego działania po dozowaniu. Stan kliniczny zwierząt powinien być rejestrowany. Co najmniej dwa razy dziennie, zwykle na początku i pod koniec każdego dnia, wszystkie zwierzęta są kontrolowane w zakresie oznak zachorowań i śmiertelności.

Przynajmniej raz przed pierwszą ekspozycją (uwzględnić w granicach porównania) i raz tygodniowo później należy dokonać szczegółowej obserwacji klinicznej na wszystkich zwierzętach. Obserwacje te powinny być dokonywane poza klatką domową, najlepiej w warunkach standardowych za każdym razem w podobnych porach. Powinny one być starannie zapisane, najlepiej przez zastosowanie systemów punktacji, wyraźnie określonych przez laboratorium badawcze. Należy dołożyć starań w celu zapewnienia, aby zmiany w warunkach obserwacji były minimalne. Oznaki zauważone powinny obejmować zmiany na skórze, futrze, oczach, błonach śluzowych, występowania wydzielin i czynności autonomiczne (np. łzawienie, piloerekcja, rozmiar źrenic, zmieniony rytm oddychania), lecz nie powinny być ograniczone tylko do nich. Zmiany w chodzie, postawie i reakcja na obchodzenie się, jak również obecność zachowań klonicznych i tonicznych, stereotypów (np. nadmierne zajmują się sobą, kołowacizna) lub dziwaczne zachowanie (np. samookaleczanie, chodzenie wstecz) także muszą być zarejestrowane (1).

Badanie oftalmologiczne przy użyciu oftalmoskopu lub równoważnego odpowiedniego przyrządu musi być wykonane przed podawaniem dawek badanej substancji i przy ukończeniu badań, najlepiej na wszystkich zwierzętach, ale przynajmniej w grupach wysokiej dawki i kontrolnej. Jeśli wykryto zmiany w oczach, należy przebadać wszystkie zwierzęta.

Odnośnie do końca okresu ekspozycji, a w żadnym przypadku nie wcześniej niż w 11 tygodniu, należy przeprowadzić badania reaktywności sensorycznej na bodźce różnych typów (1) (np. na bodźce słuchowe, optyczne i proprioreceptoryczne) (2)(3)(4), ocenę siły chwytu (5) i ocenę aktywności motorycznej (6). Dalsze szczegóły procedur do przeprowadzenia są podane w odpowiednich odniesieniach. Jednakże można także zastosować procedury alternatywne do tych, do których dokonano odniesień.

Obserwacje funkcjonalne prowadzone odnośnie do końca badań mogą być pominięte, jeśli dane dotyczące obserwacji funkcjonalnych są dostępne z innych badań i codzienne kliniczne obserwacje nie ujawniają żadnych deficytów funkcjonalnych.

▼B

Wyjątkowo, obserwacje funkcjonalne mogą być także pominięte w odniesieniu do grup, które w inny sposób przejawiają oznaki zatrucia do tego stopnia, że mogłyby znacznie zakłócić wykonanie badania funkcjonalnego.

1.5.2.1. *Waga ciała i spożycie pokarmu/wody*

Wszystkie zwierzęta powinny być ważone przynajmniej raz na tydzień. Pomiary spożycia pokarmu powinny być dokonywane przynajmniej co tydzień. Jeśli substancja badana jest podawana w wodzie pitnej, spożycie wody musi być także mierzone przynajmniej cotygodniowo. Spożycie wody może być także rozważone w odniesieniu do badań pokarmowych lub zgłębnika, w czasie których pragnienie może się zmienić.

1.5.2.2. *Biochemia kliniczna i hematologia*

Próbki krwi powinny być pobrane z nazwanego siedliska i przechowywane, jeśli ma to zastosowanie, we właściwych warunkach. Na końcu okresu badania próbki są zbierane tuż przed procedurą zabijania zwierząt lub jako jej część.

Następujące badania hematologiczne powinny być wykonane pod koniec okresu badania, a także gdy wszystkie pośrednie próbki krwi muszą zostać zebrane: hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczba erytrocytów, całkowita i różnicowa liczba leukocytów, liczba płytek krwi i pomiar czasu/potencjał krzepnięcia krwi.

Oznaczenia biochemii klinicznej do badań głównych skutków toksycznych w tkankach, w szczególności działań na nerki i wątrobę, powinny być wykonane na próbkach krwi, uzyskanych od każdego zwierzęcia tuż przed lub jako część procedury zabijania zwierząt (oddzielnie od tych, które okazały się konające i/lub zabite w międzyczasie). W sposób podobny do badań hematologicznych może być wykonane pobieranie próbek w trakcie badań dla przeprowadzenia klinicznych badań biochemicznych. Zaleca się przetrzymanie zwierząt przez noc, przed pobraniem próbek krwi ([1]). Oznaczenia w plazmie lub surowicy muszą zawierać sód, potas, glukozę, całkowity cholesterol, mocznik, azot mocznikowy we krwi, kreatyninę, całkowite proteiny i albuminy i więcej niż dwa enzymy charakterystyczne efektów wątrobokomórkowych (takich jak alanina, aminotransferaza, asparaginian aminotransferazy, fosfataza alkaliczna, gamma glutamylotranspeptydaza i dehydrogenaza sorbitolowa). Można także włączyć pomiary dodatkowych enzymów (wątrobowego lub innego pochodzenia) i kwasów żółciowych, które pod pewnymi warunkami mogą dostarczyć użytecznych informacji.

Fakultatywnie można przeprowadzić następujące oznaczenia analityczne w moczu, w ciągu ostatniego tygodnia badań, stosując zebraną czasowo objętość moczu: przejrzystość, objętość, osmolality lub ciężar właściwy, pH, białka, glukoza i komórki krwi.

Dodatkowo należy rozważyć zastosowanie do badań surowicy znaczników ogólnego uszkodzenia tkanek. Inne oznaczenia, które powinny być dokonane, jeśli znane właściwości substancji badanej mogą lub są podejrzane o wpływ na przebieg metabolizmu, to wapń, fosfor, trwałe trójglicerydy, specyficzne hormony, metahemoglobina i cholinoesteraza. Mogą być one potrzebne do określenia niektórych związków chemicznych w niektórych klasach lub na zasadzie jednostkowych przypadków.

([1]) W odniesieniu do niektórych oznaczeń w surowicy i plazmie, najbardziej znacząco dla glukozy, zaleca się niekarmienie przez noc. Główną przyczyną tego zalecenia jest wzrost zmienności, który nieuchronnie powstaje przy nieprzestrzeganiu tego zalecenia i powoduje tendencję maskowania bardziej subtelnych efektów, co czyni interpretacje wyników trudną. Z drugiej jednak strony, niekarmienie przez noc może zakłócać ogólny metabolizm zwierząt, w szczególności w badaniach żywieniowych, może przeszkadzać w dziennej ekspozycji na działanie substancji badanej. Jeśli przyjęto metodę niekarmienia przez noc, kliniczne oznaczenia biochemiczne muszą być wykonane po wprowadzeniu do badań uwag funkcjonalnych.

▼B

Ogólnie, potrzebne jest elastyczne podejście, w zależności od gatunku oraz obserwowanych i/lub spodziewanych skutków pochodzących od danej substancji.

Jeśli historyczne dane bazowe są nieodpowiednie należy rozważyć czy hematologiczne i kliniczne biochemiczne zmiany powinny być określone przed rozpoczęciem dawkowania; zasadniczo nie jest zalecane, aby te dane były gromadzone przed traktowaniem (7).

1.5.2.3. *Całościowa sekcja zwłok*

Wszystkie zwierzęta w badaniu podlegają pełnej, szczegółowej całościowej sekcji zwłok, która obejmuje staranne badanie zewnętrznej powierzchni organu, wszystkie otwory i czaszkowe, piersiowe i brzuszne jamy i ich zawartości. Wątroba, nerka, nadnercza, jądra, najądrza, macica, jajniki, grasica, śledziona, mózg i serce wszystkich zwierząt (oddzielnie od tych, które okazały się konające i/lub zabite w międzyczasie) powinny być okrojone z wszelkich przylegających tkanek, odpowiednio, i należy tak szybko jak to możliwe pomierzyć ich mokrą wagę po sekcji w celu zapobieżenia wyschnięciu.

Następujące tkanki powinny być zakonserwowane w najwłaściwym środku utrwalającym dla obu typów tkanek i zamierzonych kolejnych badań histopatologicznych: wszystkie całkowite uszkodzenia, mózg (reprezentatywne obszary, włączając płaszcz mózgu, móżdżek i szpik/mostek), rdzeń kręgowy (na trzech poziomach: karkowym, środkowo-piersiowym i lędźwiowym), przysadka, tarczyca, przytarczyczka, grasica, przełyk, gruczoły ślinowe, żołądek, małe i duże jelita (włączając plamy Peyera), wątroba, trzustka, nerki, nadnercza, śledziona, serce, tchawica i płuca (zabezpieczone przez inflację utrwaloną a następnie zanurzoną), aorta, gonady, macica, dodatkowe organy płciowe, żeńskie gruczoły sutkowe, prostata, pęcherz moczowy, pęcherzyk żółciowy (mysz), węzły limfatyczne (najlepiej jeden węzeł pokrywający drogę podawania i drugi odległy od drogi podawania aby objąć działania na układ), nerw peryferyjny (kulszowy lub piszczelowy) zalecany w dużej bliskości od mięśnia, fragment kości szpikowej (i/lub świeża kość z zassanym szpikiem), skóra i oczy (jeśli zaobserwowano zmiany podczas badań oftalmologicznych). Kliniczne i inne wyniki badań mogą zasugerować konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Także jakiekolwiek organy uznane za mogące być celem w oparciu o znane właściwości badanej substancji powinny być zakonserwowane.

1.5.2.4. *Histopatologia*

Pełna histopatologia powinna być przeprowadzona na zakonserwowanych ciałach i tkankach wszystkich zwierząt z grupy kontrolnej i wysokodawkowanej. Badania te powinny być rozciągnięte na wszystkie inne dawkowane grupy, jeśli w wysokodawkowanej grupie obserwuje się zmiany związane z działaniem środka.

Należy przebadać wszystkie zmiany patologiczne.

Jeśli używa się grupy satelickiej, histopatologia powinna być przeprowadzona na tkankach i ciałach określonych jako wykazujące działanie, w grupach traktowanych.

▼B

2. **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

2.1. DANE

Należy przedstawić dane osobnika. Dodatkowo wszystkie dane powinny być zestawione w postaci tabelarycznej, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które poniosły śmierć podczas trwania badania lub które zabito z przyczyn humanitarnych wraz z czasem, w którym nastąpiła śmierć lub humanitarne zabicie, liczbę wykazującą oznaki zatrucia, opis obserwowanych oznak zatrucia, włączając czas zaistnienia, czas trwania, stopień ciężkości każdego działania toksycznego, liczbę zwierząt wykazującą zmiany patologiczne, typ zmian patologicznych i procent zwierząt obrazujący każdy typ zmiany patologicznej.

Gdy ma to zastosowanie, wyniki liczbowe powinny być szacowane właściwymi i ogólnie przyjętymi metodami statystycznymi. Metody statystyczne i dane poddawane analizie powinny być wybrane w czasie przygotowania projektu badań.

2.2. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie dotyczące badań musi zawierać następujące informacje:

2.2.1. **Substancja użyta w badaniu:**

— charakter fizyczny, czystość i właściwości fizyko-chemiczne,

— dane identyfikacyjne,

— nośnik (jeśli jest to stosowne): uzasadnienie wyboru nośnika, jeśli jest różny od wody.

2.2.2. **Gatunki użyte w badaniu:**

— użyte gatunki i szczep,

— ilość, wiek i płeć zwierząt,

— źródło, warunki zamieszkiwania, pokarm itp.,

— waga osobnicza zwierząt przy rozpoczęciu badania.

2.2.3. **Warunki badania:**

— racjonalne uzasadnienie wybranego poziomu dawkowania,

— szczegółowe informacje dotyczące składu badanej substancji/przygotowanie pokarmu, uzyskane stężenie, stabilność i jednorodność przygotowania,

— szczegółowe informacje dotyczące podawania substancji badanej,

— dawka rzeczywista (mg/kg waga ciała/dzień), wskaźnik konwersji pokarm/woda pitna stężenia badanej substancji (ppm) do dawki rzeczywistej, jeśli ma to zastosowanie,

— szczegółowe informacje dotyczące jakości żywności i wody.

2.2.4. **Wyniki:**

— waga ciała oraz zmiany wagi ciała,

— spożycie żywności i wody, jeśli ma to zastosowanie,

— dane reakcji na zatrucie według płci i poziomu dawki, włączając oznaki zatrucia,

▼B

— charakter, surowość i czas trwania obserwacji klinicznych (stan odwracalny czy nie),

— wyniki badania oftalmologicznego,

— ocena czynności sensorycznych, siły zacisku i czynności motorycznych (gdy jest to dostępne),

— badania hematologiczne z odpowiednimi wartościami poziomów tolerancji,

— biochemiczne badania kliniczne z odpowiednimi wartościami poziomów tolerancji,

— końcowa waga ciała, waga organów i proporcje wagi organ/ciało,

— ustalenia sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich histopatologicznych wyników badań,

— dane dotyczące absorpcji, jeśli jest to dostępne,

— statystyczne opracowywanie wyników, tam gdzie jest to stosowne.

Omówienie wyników.

Wnioski.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(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, pp. 999–1003.

(3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 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, pp. 267–283.

(5) Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C, Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 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, pp. 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, pp. 198–201.

▼B

B.27. BADANIE TOKSYCZNOŚCI PODPRZEWLEKŁEJ DROGĄ POKARMOWĄ – BADANIA TOKSYCZNOŚCI NA NIEGRYZONIACH METODĄ POWTARZANEJ 90-DNIOWEJ DAWKI DROGĄ POKARMOWĄ

1. **METODA**

Niniejsza metoda badania toksyczności podprzewlekłej drogą pokarmową jest kopią OECD TG 409 (1998).

1.1. WPROWADZENIE

Przy oszacowaniu i ocenie cech toksyczności substancji chemicznej oznaczenie podprzewlekłej toksyczności drogą pokarmową, stosując powtarzane dawki, może być prowadzone po początkowej informacji o toksyczności, uzyskanej z 28-dniowych badań toksyczności ostrej lub powtarzanej. 90-dniowe badanie dostarcza informacji o możliwym niebezpieczeństwie dla zdrowia, które prawdopodobnie powstanie z powtarzanego narażenia przez okres szybkiego rozwoju do wczesnej dorosłości. Badanie dostarczy informacji na temat głównych toksycznych działań, wskaże zaatakowane organy i możliwości akumulacji, dostarczy oceny poziomu ekspozycji nie powodującego negatywnych skutków, którą stosuje się przy wyborze poziomów dawki dla badań przewlekłych i ustalania kryteriów bezpieczeństwa dla narażenia ludzi.

Metoda badania umożliwia określenie u gatunków należących do niegryzoni negatywnych skutków ekspozycji na działanie chemiczne oraz powinna być wykorzystywana tylko:

— w przypadku gdy skutki zaobserwowane w innych badaniach wymagają wyjaśnienia/charakterystyki dla drugiego gatunku niegryzoni, lub

— w przypadku gdy badania toksykokinetyczne wskazują, że wykorzystanie właściwego gatunku niegryzoni jest najbardziej trafnym wyborem ze zwierząt laboratoryjnych, lub

— w przypadku gdy inne właściwe przyczyny usprawiedliwiają wykorzystanie gatunku niegryzoni.

Zob. także Ogólne wprowadzenie część B.

1.2. DEFINICJE

Dawka: jest ilością podawanej substancji badanej. Dawka jest wyrażana wagowo (g, mg) lub jako waga substancji badanej na jednostkę wagi badanego zwierzęcia (np. mg/kg), lub jako stężenie stałe żywieniowe (ppm).

Dawkowanie: jest ogólnym pojęciem obejmującym dawkę, jej częstotliwość i czas podawania dawki.

NOAEL: jest skrótem od poziomu, przy którym nie obserwuje się niekorzystnych skutków, oraz jest najwyższym poziomem dawki, gdzie nie obserwuje się niekorzystnych efektów zależnych od podawanej substancji.

1.3. ZASADA METODY BADANIA

Substancja badana jest codziennie podawana doustnie w stopniowanych dawkach, kilku grupom zwierząt doświadczalnych, jeden poziom dawki na grupę przez okres 90 dni. W czasie okresu podawania zwierzęta są ściśle obserwowane na oznaki zatrucia. Zwierzęta, które zmarły lub zostały zabite w czasie trwania badania, są poddawane sekcji zwłok po zakończeniu badania; zwierzęta, które przeżyły są również zabijane i poddawane sekcji zwłok.

▼B

1.4. OPIS METODY BADANIA

1.4.1. **Dobór gatunków zwierząt**

Zwykle wykorzystywanym gatunkiem niegryzoni jest pies, który powinien być określonej rasy; często wykorzystywany jest pies gończy. Inne gatunki, np. małe świnie, mogą być również wykorzystane. Naczelne nie są zalecane, a ich wykorzystanie powinno być uzasadnione. Powinny być wykorzystane młode, zdrowe zwierzęta, a w przypadku psa wskazane jest rozpoczęcie dawkowania w wieku 4–6 miesięcy i nie późniejszym niż dziewięć miesięcy. W przypadku gdy badanie jest prowadzone jako wstępne do badań toksyczności przewlekłej długoterminowej, w obu badaniach należy wykorzystać ten sam gatunek/rasę.

1.4.2. **Przygotowanie zwierząt**

Powinny być wykorzystane młode zdrowe zwierzęta, zaaklimatyzowane w warunkach laboratoryjnych i nie będące przedmiotem wcześniejszych procedur eksperymentalnych. Czas trwania aklimatyzacji zależy od wybranych gatunków badanych i ich źródła pochodzenia. Zalecane jest przynajmniej pięć dni w odniesieniu do psów albo celowo hodowanej trzody od rezydenta kolonii i co najmniej dwa tygodnie w odniesieniu do zwierząt z zewnętrznych źródeł. Zwierzęta badane powinny charakteryzować się gatunkiem, szczepem, źródłem, płcią, wagą i/lub wiekiem. Zwierzęta powinny być losowo wyznaczane do doświadczeń kontrolnych i grup traktowanych. Klatki powinny być rozmieszczone w taki sposób, aby możliwy wpływ wynikający z ich umieszczania był zminimalizowany. Każde zwierzę musi być oznakowane niepowtarzalnym numerem identyfikacyjnym.

1.4.3. **Przygotowanie dawek**

Substancja badana jest podawana w postaci pokarmu lub wody pitnej, przez zgłębnik lub w kapsułkach. Metoda podawania drogą pokarmową jest zależna od celu badania oraz właściwości fizyko-chemicznych badanego materiału.

Tam gdzie jest to konieczne, badaną substancje rozpuszcza się lub wykonuje zawiesinę w odpowiednim nośniku. Zalecane jest, aby tam gdzie to jest możliwe, rozważyć wpierw użycie roztworu lub zawiesiny wodnej, a następnie rozważyć wykonanie roztworu/zawiesiny w oleju (np. w oleju kukurydzianym) i dopiero następnie w innych nośnikach. Dla nośników różnych od wody muszą być znane cechy toksyczności. Powinna być określona stabilność badanej substancji w warunkach podawania dawek.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Ilość i płeć zwierząt**

Co najmniej osiem zwierząt (cztery samice i cztery samce) należy wykorzystać w odniesieniu do każdego poziomu dawki. Jeśli planuje się zabijanie w trakcie, liczba powinna być zwiększona o przewidzianą ilość zwierząt do zabicia przed zakończeniem badań. Liczba zwierząt na końcu badania musi być odpowiednia do celów wnikliwego oszacowania toksycznych skutków. W oparciu o uprzednią znajomość substancji lub bliskiego odpowiednika należy rozważyć włączenie dodatkowej, satelickiej grupy ośmiu zwierząt (po cztery każdej płci) do grupy kontrolnej i grupy najwyżej dawkowanej do celów obserwacji po okresie czasu traktowania, odwracalności lub trwałości jakichkolwiek skutków toksycznych. Czas trwania tego okresu po traktowaniu powinien być ustalony odpowiednio w odniesieniu do obserwowanych skutków.

▼B

1.5.2. **Poziomy dawek**

Stosuje się co najmniej trzy poziomy dawek i równoczesne doświadczenie kontrolne, poza przypadkiem gdy prowadzone jest badanie graniczne (zob. 1.5.3). Poziomy dawek mogą być oparte na wynikach powtarzanej dawki lub badaniach ustalania zakresu oraz powinny uwzględniać wszelkie istniejące dane toksykologiczne i toksykokinetyczne, dostępne w odniesieniu do badanej substancji lub związanych z nią materiałów. Poza ograniczeniami natury fizykochemicznej i działaniami biologicznymi substancji badanej, poziom najwyższej dawki musi być wybrany w celu wzbudzenia objawów toksycznych, ale nie spowodowania śmierci czy też poważnych cierpień. Opadająca sekwencja poziomu dawki musi być wybrana w celu pokazania reakcji związanej z dawkowaniem i poziomem, przy którym nie obserwuje się negatywnych skutków (NOAEL) przy najniższym poziomie dawki. Dwa do czterech zachodzące przedzialy są często optymalne do ustalenia opadających poziomów dawki i dodanie czwartej grupy badanej jest często polecane dla zastosowania bardzo dużych odstępów (np. więcej niż współczynnik 6–10) między dawkowaniami.

Grupa kontrolna musi być grupą nietraktowaną lub grupą kontrolną nośnika, jeśli nośnik jest używany do podawania substancji badanej. Zwierzęta w grupie kontrolnej, poza nietraktowaniem jej substancją badaną, są obsługiwane w identyczny sposób jak w zwierzęta w grupach badanych. Jeśli stosowany jest nośnik, grupa kontrolna musi otrzymywać nośnik w maksymalnie stosowanej objętości. Gdy substancja badana jest podawana w diecie i powoduje zmniejszenie zapotrzebowania żywieniowego, wtedy grupa kontrolna z pary żywieniowej może być pomocna w rozróżnieniu między zmniejszeniem spowodowanym odczuwaniem smaku lub zmianami toksykologicznymi w modelu badania.

Następujące cechy nośnika i innych dodatków muszą być rozważone jako właściwe: wpływ wchłaniania, rozkładu, metabolizmu, retencji badanej substancji, wpływ właściwości chemicznych substancji badanej, mogące zmienić jej cechy toksyczności, oraz wpływy zapotrzebowania na żywność i wodę lub żywieniowy status zwierząt.

1.5.3. **Badanie graniczne**

Jeśli badanie przy jednym poziomie dawki, równoważnym co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała/dzień, stosując procedurę opisaną w odniesieniu do niniejszego badania, powoduje, że nie obserwuje się negatywnych skutków oraz jeśli nie oczekuje się toksyczności na podstawie danych substancji strukturalnie związanych, wtedy pełne badania z zastosowaniem trzech poziomów nie wydają się konieczne. Badanie graniczne ma zastosowanie z wyjątkiem sytuacji, gdy narażenie ludzi wskazuje potrzebę zastosowania wyższego poziomu dawki.

1.5.4. **Podawanie dawek**

Zwierzętom dozuje się substancję badaną przez siedem dni każdego tygodnia w okresie 90 dni. Każdy inny sposób dozowania, na przykład pięć dni w tygodniu, wymaga uzasadnienia. Gdy substancja badana jest podawana przez zgłębnik, musi być to wykonane w pojedynczej dawce, przy użyciu sondy przelykowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Maksymalna objętość cieczy, która może być podana w jednym momencie, zależy od rozmiarów zwierzęcia badanego. Zwykle objętość powinna być utrzymywana na możliwe najmniejszym poziomie. Z wyjątkiem substancji drażniących i żrących, które zwykle ujawniają silniejsze działanie przy wyższym stężeniu, zmienności w objętości badanej muszą być zminimalizowane przez ustawienie stężenia tak, aby zapewnić stałą objętość we wszystkich poziomach dozowania.

▼B

W odniesieniu do substancji podawanych w pokarmie lub wodzie pitnej istotne jest zapewnienie, aby ilości danej substancji badanej nie kolidowały z normalnym odżywianiem lub równowagą wodną. Gdy substancja badana jest podawana w pokarmie – w stałym stężeniu w pokarmie (ppm) albo w stałym poziomie dawki – może być zastosowana w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia; wykorzystana alternatywa musi być określona. W odniesieniu do substancji podawanej przez zgłębnik, dawka musi być podana w podobnej porze każdego dnia i regulowana tak by utrzymać stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia. W przypadku gdy badanie 90-dniowe jest stosowane jako wstępne do badań długoterminowych toksyczności przewlekłej, w obu badaniach powinien być użyty podobny pokarm.

1.5.5. **Obserwacje**

Okres obserwacji powinien wynosić przynajmniej 90 dni. Zwierzęta w grupie satelickiej, zaplanowanej do dalszej obserwacji, muszą być trzymane przez stosowny okres bez traktowania w celu wykrycia wytrzymałości na lub powrotu do normy od działań toksycznych.

Ogólne kliniczne obserwacje powinny być dokonywane przynajmniej raz na dzień, najlepiej o tej (tych) samej(-ych) porze (porach) każdego dnia, uwzględniając szczytowy okres przewidywanego działania po dozowaniu. Stan kliniczny zwierząt powinien być rejestrowany. Co najmniej dwa razy dziennie, zwykle na początku i pod koniec każdego dnia, wszystkie zwierzęta są kontrolowane w zakresie oznak zachorowań i śmiertelności.

Przynajmniej raz przed pierwszą ekspozycją (uwzględnić w granicach porównania) i raz tygodniowo później należy dokonać szczegółowej obserwacji klinicznej na wszystkich zwierzętach. Obserwacje te powinny być dokonywane poza klatką domową, najlepiej w warunkach standardowych za każdym razem w podobnych porach. Powinny one być starannie zapisane, najlepiej przez zastosowanie systemów punktacji, wyraźnie określonych przez laboratorium badawcze. Należy dołożyć starań w celu zapewnienia, aby zmiany w warunkach obserwacji były minimalne. Oznaki zauważone powinny obejmować zmiany na skórze, futrze, oczach, błonach śluzowych, występowania wydzielin i czynności autonomiczne (np. łzawienie, piloerekcja, rozmiar źrenic, zmieniony rytm oddychania), lecz nie powinny być ograniczone tylko do nich. Zmiany w chodzie, postawie i reakcja na obchodzenie się, jak również obecność zachowań klonicznych i tonicznych, stereotypów (np. nadmierne zajmowanie się sobą, kolowacizna) lub dziwaczne zachowanie (np. samookaleczanie, chodzenie wstecz) także muszą być zarejestrowane.

Badanie oftalmologiczne przy użyciu oftalmoskopu lub równoważnego odpowiedniego przyrządu musi być wykonane przed podawaniem dawek badanej substancji i przy ukończeniu badań, najlepiej na wszystkich zwierzętach, ale przynajmniej w grupach wysokiej dawki i kontrolnej. Jeśli wykryto zmiany w oczach, należy przebadać wszystkie zwierzęta.

1.5.5.1. *Waga ciała i i spożycie pokarmu/wody*

Wszystkie zwierzęta powinny być ważone przynajmniej raz na tydzień. Pomiary spożycia pokarmu powinny być dokonywane przynajmniej co tydzień. Jeśli substancja badana jest podawana w wodzie pitnej, spożycie wody musi być także mierzone przynajmniej cotygodniowo. Spożycie wody może być także rozważone w odniesieniu do badań pokarmowych lub zgłębnika, w czasie których pragnienie może się zmienić.

▼B

1.5.5.2. *Biochemia kliniczna i hematologia*

Próbki krwi powinny być pobrane z nazwanego siedliska i przechowywane, jeśli ma to zastosowanie, we właściwych warunkach. Na końcu okresu badania próbki są zbierane tuż przed procedurą zabijania zwierząt lub jako jej część.

Hematologia, włączając hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczba erytrocytów, całkowita i różnicowa liczba leukocytów, liczba płytek krwi i pomiar potencjału krzepliwości takiego jak czas krzepliwości, czas protrombinowy i tromboplastynowy, powinna być zbadana na początku badania, następnie albo w odstępach miesięcznych albo w środku okresu badania oraz ostatecznie pod koniec okresu badania.

Oznaczenia biochemii klinicznej do badań głównych skutków toksycznych w tkankach, w szczególności działań na nerki i wątrobę, powinny być wykonane na próbkach krwi, uzyskanych od każdego zwierzęcia na początku, następnie albo odstępach miesięcznych albo w środku okresu badania oraz ostatecznie pod koniec okresu badania. Dziedzinami badań, które muszą być rozważone, są równowaga elektrolitów, metabolizm węglowodanów oraz funkcje wątroby i nerek. Na wybór specyficznych badań wpływają obserwacje sposobu działania substancji badanej. Zwierzęta powinny być przetrzymane przez okres odpowiedni do gatunku przed pobieraniem próbek krwi. Zalecane oznaczenia obejmują wapń, fosfor, chlorki, sód, potas, glukozę, aminotransferazę alaninową, aminotransferaze asparaginową, dekarboksylazę ornityny, gamma glutamylową transpeptydazę, azot mocznikowy, albuminy, kreatyninę krwi, całkowitą bilirubinę i całkowitą surowicę białkową.

Oznaczenia analityczne w moczu powinny być wykonane przynajmniej na początku, następnie w środku i pod koniec badania, stosując zebraną czasowo objętość moczu. Oznaczenia moczu obejmują przejrzystość, objętość, osmolality lub ciężar właściwy, pH, białka, glukoza i komórki krwi. Inne parametry dodatkowo mogą być oznaczane w miarę potrzeb rozszerzenia badania zaobserwowanego(-ych) skutku(-ów).

Ponadto należy rozważyć zastosowanie do badań surowicy znaczników ogólnego uszkodzenia tkanek. Inne oznaczenia, które mogą być niezbędne do odpowiedniej oceny toksykologicznej, obejmują lipidy, hormony, równowagę kwasowo-zasadową, metahemoglobinę, inhibitory cholinoesterazy. Dodatkowe badania kliniczne mogą być wykorzystywane, gdy niezbędne jest rozszerzenie badania zaobserwowanych skutków. Mogą być one potrzebne do określenia niektórych związków chemicznych w niektórych klasach lub na zasadzie jednostkowych przypadków.

Ogólnie, potrzebne jest elastyczne podejście, w zależności od gatunku oraz obserwowanych i/lub spodziewanych skutków pochodzących od danej substancji.

1.5.5.3. *Całościowa sekcja zwłok*

Wszystkie zwierzęta w badaniu podlegają pełnej, szczegółowej brutto sekcji zwłok, która obejmuje staranne badanie zewnętrznej powierzchni organu, wszystkie otwory i czaszkowe, piersiowe i brzuszne jamy i ich zawartości. Wątroba, nerka, nadnercza, jądra, najądrza, macica, jajniki, grasica, śledziona, mózg i serce wszystkich zwierząt (oddzielnie od tych, które okazały się konające i/lub zabite w międzyczasie) powinny być okrojone z wszelkich przylegających tkanek, odpowiednio, i należy tak szybko jak to możliwe pomierzyć ich mokrą wagę po sekcji w celu zapobieżenia wyschnięciu.

▼B

Następujące tkanki powinny być zakonserwowane w najwłaściwszym środku utrwalającym dla obu typów tkanek i zamierzonych kolejnych badań histopatologicznych: wszystkie całkowite uszkodzenia, mózg (reprezentatywne obszary, włączając płaszcz mózgowy, móżdżek i szpik/mostek), rdzeń kręgowy (na trzech poziomach: karkowym, środkowo-piersiowym i lędźwiowym), przysadka, tarczyca, przytarczyczka, grasica, przełyk, gruczoły ślinowe, żołądek, małe i duże jelita (włączając plamy Peyera), wątroba, trzustka, nerki, nadnercza, śledziona, serce, tchawica i płuca (zabezpieczone przez inflację utrwaloną a następnie zanurzoną), aorta, gonady, macica, dodatkowe organy płciowe, żeńskie gruczoły sutkowe, prostata, pęcherz moczowy, pęcherzyk żółciowy (mysz), węzły limfatyczne (najlepiej jeden węzeł pokrywający drogę podawania i drugi odległy od drogi podawania, aby objąć działania na układ), nerw peryferyjny (kulszowy lub piszczelowy) zalecany w dużej bliskości od mięśnia, fragment kości szpikowej (i/lub świeża kość z zassanym szpikiem), skóra i oczy (jeśli zaobserwowano zmiany podczas badań oftalmologicznych). Kliniczne i inne wyniki badań mogą zasugerować konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Także jakiekolwiek organy uznane za mogące być celem w oparciu o znane właściwości badanej substancji powinny być zakonserwowane.

1.5.5.4. *Histopatologia*

Pełna histopatologia powinna być przeprowadzona na zakonserwowanych ciałach i tkankach wszystkich zwierząt z grupy kontrolnej i wysokodawkowanej. Badania te powinny być rozciągnięte na wszystkie inne dawkowane grupy, jeśli w wysokodawkowanej grupie obserwuje się zmiany związane z działaniem środka.

Należy przebadać wszystkie zmiany patologiczne.

Jeśli używa się grupy satelickiej, histopatologia powinna być przeprowadzona na tkankach i ciałach, określonych jako wykazujące działanie, w grupach traktowanych.

2. DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

2.1. DANE

Należy przedstawić dane osobnika. Dodatkowo, wszystkie dane powinny być zestawione w postaci tabelarycznej, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które poniosły śmierć podczas trwania badania lub które zabito z przyczyn humanitarnych wraz z czasem, w którym nastąpiła śmierć lub humanitarne zabicie, liczbę wykazującą oznaki zatrucia, opis obserwowanych oznak zatrucia, włączając czas zaistnienia, czas trwania, stopień ciężkości każdego działania toksycznego, liczbę zwierząt wykazującą zmiany patologiczne, typ zmian patologicznych i procent zwierząt obrazujący każdy typ zmiany patologicznej.

Gdy ma to zastosowanie, wyniki liczbowe powinny być szacowane właściwymi i ogólnie przyjętymi metodami statystycznymi. Metody statystyczne i dane poddawane analizie, powinny być wybrane w czasie przygotowania projektu badań.

2.2. SPRAWOZDANIE DOTYCZĄCE BADAŃ

Sprawozdanie dotyczące badań musi zawierać następujące informacje:

▼B

2.2.1. **Substancja użyta w badaniu:**

— charakter fizyczny, czystość i właściwości fizyko-chemiczne,

— dane identyfikacyjne,

— nośnik (jeśli jest to stosowne): uzasadnienie wyboru nośnika, jeśli jest różny od wody.

2.2.2. **Gatunki użyte w badaniu:**

— użyte gatunki i szczep,

— ilość, wiek i płeć zwierząt,

— źródło, warunki zamieszkiwania, pokarm itp.,

— waga osobnicza zwierząt przy rozpoczęciu badania.

2.2.3. **Warunki badania:**

— racjonalne uzasadnienie wybranego poziomu dawkowania,

— szczegółowe informacje dotyczące składu badanej substancji/przygotowanie pokarmu, uzyskane stężenie, stabilność i jednorodność przygotowania,

— szczegółowe informacje dotyczące podawania substancji badanej,

— dawka rzeczywista (mg/kg waga ciała/dzień), wskaźnik konwersji pokarm/woda pitna stężenia badanej substancji (ppm) do dawki rzeczywistej, jeśli ma to zastosowanie,

— szczegółowe informacje dotyczące jakości żywności i wody.

2.2.4. **Wyniki:**

— waga ciała oraz zmiany wagi ciała,

— spożycie żywności i wody, jeśli ma to zastosowanie,

— dane reakcji na zatrucie według płci i poziomu dawki, włączając oznaki zatrucia,

— charakter, surowość i czas trwania obserwacji klinicznych (stan odwracalny czy nie),

— wyniki badania oftalmologicznego,

— ocena czynności sensorycznych, siły zacisku i czynności motorycznych (gdy jest to dostępne),

— badania hematologiczne z odpowiednimi wartościami poziomów tolerancji,

— biochemiczne badania kliniczne z odpowiednimi wartościami poziomów tolerancji,

— końcowa waga ciała, waga organów i proporcje wagi organ/ciało,

— ustalenia sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich histopatologicznych wyników badań,

— dane dotyczące absorpcji, jeśli jest to dostępne,

— statystyczne opracowanie wyników, tam gdzie jest to stosowne.

Omówienie wyników.

Wnioski.

▼B

B.28. **BADANIE PODCHRONICZNEJ TOKSYCZNOŚCI SKÓRY – 90-DNIOWE BADANIA POWTARZANEGO DAWKOWANIA NA SKÓRZE Z WYKORZYSTANIEM GATUNKÓW GRYZONI**

1. **METODA**

1.1. WSTĘP

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

1.2. DEFINICJE

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak

1.4. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Substancja testowa jest nanoszona codziennie na skórę, w stopniowanych dawkach, kilku grupom zwierząt badanych, jedna dawka na grupę przez okres 90 dni. W okresie podawania dawki zwierzęta obserwowane są codziennie celem wykrycia objawów toksyczności. Zwierzęta, które zdechną w czasie trwania badania, poddawane są sekcji zwłok, a na zakończenie badania zwierzęta pozostałe przy życiu są zabijane i również poddawane sekcji zwłok.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

Brak.

1.6. OPIS METODY BADAWCZEJ

Przygotowania

Zwierzęta podlegają warunkom przebywania i żywieniowym ustalonym do celów badania przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem badania. Przed rozpoczęciem badania młode zdrowe zwierzęta są losowo przydzielane do grup badanych i kontrolnych. Tuż przed rozpoczęciem badania futro zostaje ostrzyżone w części grzbietowej tułowia badanych zwierząt. Można zastosować golenie, ale powinno być przeprowadzone około 24 godziny przed rozpoczęciem badania. Ponowne strzyżenie lub golenie jest zazwyczaj potrzebne w przybliżeniu co tydzień. Podczas strzyżenia lub golenia futra należy uważać, aby nie otrzeć skóry. Nie mniej niż 10 % powierzchni skóry powinno zostać oczyszczone w celu podania substancji testowej. Należy uwzględnić wagę zwierząt w chwili podjęcia decyzji o powierzchni oczyszczanej skóry oraz o powierzchni jej pokrycia. Badając substancje stałe, które mogą być ścierane w odpowiednich przypadkach, substancja testowa powinna być odpowiednio nawilżana wodą lub, w miarę potrzeby, za pomocą odpowiedniego nośnika w celu zapewnienia dobrego kontaktu ze skórą. Płynne substancje testowe na ogół są aplikowane nierozcieńczone. Substancja aplikowana jest zasadniczo przez pięć do siedmiu dni w tygodniu.

Warunki badania

Zwierzęta badane

Wykorzystywać można dorosłe szczury, króliki lub świnki morskie. W chwili rozpoczęcia badania rozpiętość różnicy wagowej powinna wynosić ± 20 % wagi średniej. W przypadku przeprowadzania podchronicznych badań na skórze jako badań wstępnych do badań długoterminowych ten sam gatunek i szczep powinny być wykorzystane w obu badaniach.

▼B

Liczba i płeć

Co najmniej 20 zwierząt (10 samic i 10 samców) ze zdrową skórą powinno być wykorzystanych na każdym z poziomów dawek. Samice powinny być niecięŜarne i takie, które nie rodziły. Jeżeli planowane są zgony zwierząt, ich liczba powinna zostać powiększona o liczbę zwierząt planowanych do uśmiercenia przed zakończeniem badań. Ponadto grupa satelitarna w ilości 20 zwierząt (10 zwierząt każdej płci) może zostać poddana wysokiej dawce przez okres 90 dni i obserwowana pod względem odwracalności, odporności, lub opóźnionego wystąpienia toksycznych skutków przez 28 dni po przeprowadzeniu czynności badawczych.

Poziomy dawek

Powinny zostać wykorzystane co najmniej trzy poziomy dawek łącznie z dawką kontrolną lub kontrolą nośnika, jeżeli jest stosowany. Okres ekspozycji na substancję powinien wynosić co najmniej sześć godzin dziennie. Substancję należy stosować o podobnych porach każdego dnia, a ilość stosowanej substancji dostosowana jest do odpowiednich odstępów czasu (tygodniowych lub dwutygodniowych), w celu utrzymania stałej dawki w odniesieniu do wagi ciała zwierząt. Oprócz stosowania substancji testowej, zwierzęta grupy kontrolnej powinny być traktowane w identyczny sposób co obiekty grupy badanej. W przypadku użycia nośnika w celu usprawnienia dawkowania grupa kontrolna przyjmuje dawki w ten sam sposób co grupy badane oraz otrzymuje tę samą ilość nośnika co ilość podawana grupie otrzymującej najwyższą dawkę. Najwyższa dawka powinna wywołać objawy toksyczności, ale nie powinna powodować lub powodować niewiele przypadków śmiertelności. Najniższa dawka nie powinna powodować żadnych objawów toksyczności. W przypadku rozważenia ekspozycji człowieka najniższa dawka powinna ją przekraczać. Najlepiej było by, gdyby średnia dawka wywoływała minimalne, dające się zaobserwować skutki toksyczności. W przypadku użycia więcej niż jednej średniej dawki należy rozszerzyć stosowane poziomy dawek w celu wywołania stopniowania skutków toksyczności. W grupach otrzymujących niskie oraz średnie dawki, oraz w grupach kontrolnych jakiekolwiek przypadki śmiertelności powinny być nieliczne w celu umożliwienia dokonania miarodajnej oceny wyników badań.

W przypadku gdy aplikowanie substancji testowej powoduje poważne podrażnienia skóry, stężenie powinno zostać obniżone, co może doprowadzić do zmniejszenia lub braku innych objawów toksyczności w grupie najwyższego dawkowania. Jeżeli skóra została poważnie uszkodzona, konieczne może okazać się zakończenie bieżących badań i podjęcie nowych badań z niższymi stężeniami.

Test graniczny

Jeżeli wstępne badanie przy dawce w wysokości 1 000 mg/kilogram lub przy wyższej dawce związanej z ewentualną ekspozycją człowieka wywołuje żadnych objawów toksyczności, dalsze badanie może być uznane za niepotrzebne.

Okres obserwacji

Zwierzęta badane powinny być codziennie obserwowane w celu wykrycia objawów toksyczności. Czas zgonu oraz czas pojawienia się i zaniku objawów toksyczności należy odnotować.

▼B

Procedura

Zwierzęta powinny zostać umieszczone w osobnych klatkach. Zwierzęta należy poddać działaniu substancji testowej najlepiej siedem dni w tygodniu, przez okres 90 dni.

Zwierzęta z grup satelitarnych przeznaczone do obserwacji uzupełniających powinny być trzymane przez dodatkowy okres 28 dni bez podawania jakichkolwiek substancji w celu stwierdzenia regeneracji lub odporności na skutki toksyczności. Czas ekspozycji powinien wynosić sześć godzin dziennie.

Substancja testowa powinna być aplikowana w sposób jednolity na powierzchni, która stanowi około 10 % ogólnej powierzchni ciała. W odniesieniu do substancji wysokotoksycznych pokryty obszar powierzchni ciała może być mniejszy ale pozostała powierzchnia powinna być pokryta tak cienką i jednolitą warstwą jak to możliwe.

W czasie ekspozycji substancja testowa wchodzi w kontakt ze skórą za pomocą porowatego opatrunku z gazy i nie drażniącej taśmy. Następnie badane miejsce powinno być w odpowiedni sposób okryte w celu utrzymania opatrunku z gazy oraz substancji testowej i zapewnienia, że zwierzę nie będzie w stanie spożyć substancji testowej. W celu zapobieżenia spożycia substancji testowej mogą zostać zastosowane środki zabezpieczające ale całkowite unieruchomienie nie jest zalecaną metodą.

Na zakończenie okresu ekspozycji, pozostała substancja testowa powinna zostać usunięta, w przypadku gdy to możliwe, za pomocą wody lub innej właściwej metody oczyszczania skóry.

Wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane codziennie a objawy toksyczności powinny być odnotowane włączając porę ich rozpoczęcia, stopień oraz czas trwania. Obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować zmiany zachodzące na ich skórze i futrze, zmiany oczu i błony śluzowej a także zmiany układu oddechowego, krążenia oraz autonomicznego i centralnego układu nerwowego, czynności somatomotorycznych oraz schematów zachowań. Powinny być dokonywane pomiary spożycia żywności oraz pomiary wagi ciała zwierząt raz w tygodniu. Regularne obserwacje zwierząt są konieczne w celu zapewnienia, że nie dochodzi do strat na zwierzętach w wyniku takich przypadków jak kanibalizm, autoliza tkanek lub nieprawidłowe umieszczenie. Na końcu okresu badania wszystkie zwierzęta pozostałe przy życiu z niesatelitarnej grupy badanej zostają zabite i poddane sekcji zwłok. Zwierzęta konające powinny być usuwane i poddawane sekcji zwłok po stwierdzeniu takiego faktu.

Wszystkie zwierzęta, włączając zwierzęta z grup kontrolnych, zwyczajowo poddawane są następującym badaniom:

a) Badanie oftalmologiczne z wykorzystaniem oftalmoskopu lub podobnego sprzętu, powinno zostać przeprowadzone przed zastosowaniem substancji testowej oraz zakończeniem badań, najlepiej na wszystkich zwierzętach, a co najmniej na zwierzętach z grupy najwyższej dawki i grupy kontrolnej. W przypadku wykrycia zmian w oczach należy przebadać wszystkie zwierzęta.

b) Hematologia, włączając hematokryt, badanie stężenia hemoglobiny, ilości krwinek czerwonych, ogólnej ilości krwinek białych i obraz białokrwinkowy, pomiar wskaźników krzepliwości krwi takich jak czas krzepnięcia, czas protrombinowy, czas tromboplastynowy, czy ilość płytek krwi powinny zostać zbadane na końcu okresu badania.

▼B

c) Powinno zostać przeprowadzone oznaczenie klinicznej biochemii krwi na końcu okresu badania. Obszarami zainteresowania uważanymi za właściwe dla wszystkich badań są: równowaga elektrolityczna, metabolizm węglowodanów, funkcje wątroby i nerek. Wybór szczególnych badań będzie uzależniony od obserwacji formy i działania substancji. Sugerowane ustalenia to: pomiar wapnia, fosforu, chlorku, sodu, potasu, stężenie glukozy na czczo (z okresem głodzenia stosownym do gatunku zwierzęcia), transaminaza pirogronianowo-glutaminowa surowicy ([1]), transaminaza szczawiowooctowoglutamylowa surowicy ([2]), dekarboksylazy ornityny, transpeptydaza gammaglutamylowa, mocznika azotu, albuminy, kreatyny krwi całkowitej bilirubiny oraz całkowitej surowicy białka. Inne ustalenia, które mogą być niezbędne do właściwej analizy toksykologicznej obejmują badania lipidów, hormonów, równowagi kwasowo-zasadowej, czynności metahemoglobiny i cholinoesteraza. Dodatkowa biochemia kliniczna może zostać zastosowana w miarę potrzeby w celu rozszerzenia badań odnośnie obserwowanych skutków.

d) Analiza moczu nie jest wymagana jako badanie rutynowe, ale jedynie w przypadku spodziewanej lub obserwowanej toksyczności.

Jeżeli dane bazowe są niewłaściwe, należy zwrócić uwagę na określenie parametrów hematologicznych i klinicznej biochemii przed rozpoczęciem dawkowania.

Całkowita sekcja zwłok

Wszystkie zwierzęta powinny być poddane całkowitej sekcji zwłok, która obejmuje badanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszelkich otworów, jamy czaszkowej, klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Wątroba, nerki, nadnercza oraz jądra powinny być zważone niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji w celu uniknięcia wyschnięcia. Poniższe organy i tkanki powinny być zachowane w odpowiednim pojemniku w celu ewentualnego przyszłego badania histopatologicznego: wszelkie zmiany patologiczne, mózg – włączając części rdzenia/most, móżdżek i kora mózgowa, przysadka mózgowa, tarczyca/przytarczyca, tkanki grasicy, (tchawica), płuca, serce, aorta, gruczoły ślinowe, wątroba, śledziona, nerki, nadnercza, trzustka, gruczoły płciowe, macica, dodatkowe organy genitaliów, woreczek żółciowy (jeżeli obecny), przełyk, żołądek, dwunastnica, jelito czcze, talerz, jelito ślepe, okrężnica, odbytnica, pęcherz moczowy, przedstawiciel pachowych węzłów chłonnych, (żeńskie gruczoły malene), (umięśnienie uda), nerwy obwodowe, (oczy), (mostek wraz ze szpikiem kostnym), (kość udowa, włączając powierzchnie stawowe), i (rdzeń kręgowy w trzech poziomach – szyjny, śródpiersiowy i lędźwiowy) i (oczodołowe gruczoły łzo we). Tkanki wymienione w nawiasach będą wymagały przebadania w przypadku powstania objawów toksyczności lub zaangażowania danych organów.

Badania histopatologiczne

a) Pełna histopatologia powinna zostać przeprowadzona na normalnej i badanej skórze oraz na organach i tkankach zwierząt w grupie kontrolnej i grupie najwyższego dawkowania.

b) Wszelkie zmiany patologiczne powinny zostać zbadane.

([1]) Obecnie znane pod nazwą aminontransferaza alaninowa surowicy.
([2]) Obecnie znane pod nazwą aminotransferaza asparaginianowa surowicy.

▼B

c) Organy docelowe działania substancji w grupach innego dawkowania powinny zostać zbadane.

d) W przypadku gdy wykorzystywane są szczury, płuca zwierząt w grupach niskiego i średniego dawkowania powinny zostać poddane badaniu histopatologicznemu w celu stwierdzenia dowodów infekcji, ponieważ badanie to dostarcza dogodnej analizy stanu zdrowia zwierząt. Przeprowadzanie dalszych badań histopatologicznych nie musi być wymagane jako rutynowe w odniesieniu do zwierząt w tych grupach ale zawsze musi być przeprowadzane na organach, które wykazują objawów zmian patologicznych w grupie najwyższego dawkowania.

e) W przypadku wykorzystywania grupy satelitarnej histopatologia powinna zostać przeprowadzona na tkankach i organach zidentyfikowanych jako te wykazujące skutki w grupach poddanych badaniu.

2. **DANE**

Dane powinny zostać podsumowane w formie tabeli, wykazującej liczbę zwierząt każdej badanej grupy na początku badań, liczbę zwierząt wykazujących zmiany patologiczne, rodzaj zmian oraz procent zwierząt wykazujących każdy z rodzajów zmian. Wyniki powinny zostać oszacowane właściwą metodą statystyczną. Można zastosować każdą uznaną metodę statystyczną.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań zawiera, w miarę możliwości, następujące informacje:

— gatunek lub szczep, źródło, warunki środowiska, pożywienie,

— warunki badania,

— dawkowanie (włączając nośnik, jeżeli został użyty) oraz jego stężenie,

— dane dotyczące reakcji na toksyczność ze względu na płeć i dawkę,

— brak skutków,

— czas zgonu podczas badań lub informacja o tym, czy zwierzęta przetrwały do czasu ich zakończenia,

— opis skutków toksyczności lub innych,

— okres obserwacji każdego nietypowego objawu i późniejszego postępowania,

— brak skutków,

— dane dotyczące wagi ciała i pożywienia,

— wyniki badań oftalmologicznych,

— zastosowane badania hematologiczne oraz wszystkie wyniki,

— zastosowane kliniczne badania biochemiczne oraz wszystkie wyniki (włączając wyniki wszelkich analiz moczu),

▼B

— wyniki badań sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników badań histopatologicznych,

— statystyczne ujęcie wyników, jeżeli to możliwe,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2 ANALIZA I INTERPRETACJA

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

4. **ODNIESIENIA**

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

▼M4

B.29. TOKSYCZNOŚĆ PODPRZEWLEKŁA – NARAŻENIE INHALACYJNE: BADANIE 90-DNIOWE

STRESZCZENIE

Niniejszą zmienioną metodę badawczą B.29 opracowano w celu uzyskania pełnej charakterystyki toksyczności badanej substancji chemicznej wskutek narażenia inhalacyjnego przez okres toksyczności podprzewlekłej (90 dni) oraz zapewnienia danych odpornych na potrzeby ilościowych ocen ryzyka związanego z narażeniem inhalacyjnym. Grupy 10 samców i 10 samic gryzoni są przez 6 godzin dziennie w ciągu 90 dni (13 tygodni) narażane na działanie a) badanej substancji chemicznej przy co najmniej trzech poziomach stężenia; b) filtrowanego powietrza (ujemna grupa kontrolna); lub c) nośnika (grupa kontrolna nośnika). Na ogół zwierzęta narażane są na działanie substancji przez 5 dni w tygodniu, ale narażenie przez 7 dni w tygodniu również jest dozwolone. Zawsze bada się samców i samice, lecz jeśli wiadomo, że jedna płeć jest bardziej podatna na działanie danej badanej substancji chemicznej, płcie mogą być poddane narażeniu przy różnych poziomach stężenia. Metoda ta pozwala kierownikowi badania na elastyczność, jeżeli chodzi o włączenie do badania grup satelitarnych (badania odwracalności), uśmiercanie zwierząt w trakcie trwania doświadczenia, a także wprowadzenie płukania oskrzelowo-pęcherzykowego, testów neurologicznych oraz dodatkowych badań z zakresu patologii klinicznej i histopatologicznych w celu lepszego scharakteryzowania toksyczności badanej substancji chemicznej.

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 413 (OECD TG 413) (2009). Pierwotną dotyczącą badań podprzewlekłej toksyczności inhalacyjnej wytyczną nr 413 (TG 413) przyjęto w 1981 r. (1). Niniejsza metoda badawcza B.29 (równoważna zmienionej wytycznej TG 413 (2009)) została zaktualizowana w celu odzwierciedlenia stanu wiedzy naukowej oraz zaspokojenia obecnych i przyszłych potrzeb regulacyjnych.

2. Badania toksyczności podprzewlekłej wskutek narażenia inhalacyjnego są wykorzystywane przede wszystkim w celu określenia stężeń regulacyjnych na potrzeby oceny ryzyka pracowników w miejscu pracy. Stosuje się je także do ocenienia ryzyka dla ludzi związanego z zamieszkaniem i transportem oraz środowiskiem. Niniejsza metoda umożliwia scharakteryzowanie szkodliwych zmian w następstwie powtarzanego codziennego narażenia inhalacyjnego na badaną substancję chemiczną przez 90 dni (około 10 % długości życia szczura). Dane pochodzące z badań toksyczności podprzewlekłej wskutek narażenia inhalacyjnego mogą być wykorzystywane do ilościowych ocen ryzyka oraz do wyboru stężeń na potrzeby badań toksyczności przewlekłej. Niniejsza metoda badawcza nie jest przeznaczona do badania nanomateriałów. Definicje stosowane w kontekście niniejszej metody badawczej znajdują się na końcu tego rozdziału i w wytycznych (GD) nr 39 (2).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

3. Przed przeprowadzeniem badania laboratorium badawcze powinno wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej w celu poprawienia jakości badania oraz aby zminimalizować wykorzystanie zwierząt. Informacje, które będą pomocne w wyborze odpowiednich badanych stężeń, mogą obejmować nazwę chemiczną, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*; przewidywane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR i dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie powiązanych związków oraz dane pochodzące z innych badań narażenia powtarzanego. Jeżeli w trakcie badania oczekiwana lub obserwowana jest neurotoksyczność, kierownik badania może postanowić o włączeniu do badania odpowiednich ocen, takich jak zestaw badań czynnościowych i obserwacyjnych i pomiar aktywności motorycznej. Chociaż w przypadku określonych badań decydujące znaczenie może mieć moment narażenia na działanie substancji, przeprowadzanie tych dodatkowych czynności nie powinno kolidować z podstawowym projektem badania.

▼M4

4. Rozcieńczenia badanych substancji chemicznych mających działanie żrące lub drażniące można badać przy stężeniach, które dadzą pożądany stopień toksyczności. Dalsze informacje można znaleźć w GD 39 (2). Podczas narażania zwierząt na działanie tych substancji stężenia docelowe powinny być na tyle niskie, aby nie powodować silnego bólu i stresu, a zarazem wystarczające do przedłużenia krzywej stężenie-odpowiedź do poziomów, które pozwalają osiągnąć regulacyjny i naukowy cel badania. Stężenia te należy dobierać indywidualnie dla każdego przypadku, najlepiej w oparciu o odpowiednio zaprojektowane badanie ustalające zakres, które dostarcza informacji na temat krytycznego punktu końcowego, wszelkich progów powodujących działanie drażniące oraz czasu pojawienia się objawów (zob. pkt 11–13). Należy podać uzasadnienie doboru stężenia.

5. Zwierzęta w stanie agonalnym oraz zwierzęta wykazujące oczywiste oznaki bólu czy objawy ostrego i przewlekłego stresu powinny zostać uśmiercone w sposób humanitarny. Zwierzęta w stanie agonalnym traktuje się tak samo jak zwierzęta padłe w trakcie badania. Kryteria podejmowania decyzji co do uśmiercenia zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących silny ból oraz wytyczne dotyczące rozpoznawania prognozowanego lub nieuchronnie zbliżającego się zgonu są zawarte w wytycznych OECD dotyczących humanitarnego punktu końcowego (3).

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

6. Należy wykorzystać zdrowe, młode, dorosłe gryzonie pochodzące ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach. Preferowanym gatunkiem jest szczur. Jeżeli wykorzystuje się inny gatunek, należy podać uzasadnienie.

Przygotowanie zwierząt

7. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. W dniu randomizacji zwierzęta powinny być młodymi dorosłymi osobnikami w wieku od 7 do 9 tygodni. Masa ciała powinna mieścić się w granicach ± 20 % średniej masy dla każdej płci. Zwierzęta są wybierane losowo, oznaczane w sposób umożliwiający identyfikację poszczególnych osobników i przetrzymywane w klatkach przynajmniej przez 5 dni przed rozpoczęciem badania, żeby umożliwić aklimatyzację do warunków laboratoryjnych.

Hodowla zwierząt

8. W celu ułatwienia obserwacji i uniknięcia pomyłek zwierzęta powinny być indywidualnie oznakowane, najlepiej za pomocą podskórnych transponderów. Temperatura w pomieszczeniach dla zwierząt doświadczalnych powinna wynosić 22 ± 3 °C. Najlepiej byłoby, gdyby wilgotność względna była utrzymywana w przedziale 30–70 %, chociaż może to być niemożliwe w przypadku stosowania wody jako nośnika. Przed narażeniem i po nim zwierzęta na ogół należy trzymać w klatkach w grupach podzielonych według płci i badanego stężenia, lecz liczba zwierząt w klatce nie powinna przeszkadzać w dokładnej obserwacji każdego zwierzęcia, a także powinna umożliwiać zminimalizowanie strat w zwierzętach spowodowanych kanibalizmem i walkami. Jeżeli zwierzęta mają być poddane narażeniu tylko przez nos, konieczne może być ich przyzwyczajenie do rur unieruchamiających. Rury unieruchamiające nie powinny powodować nadmiernego stresu fizycznego i termicznego dla zwierząt ani stresu spowodowanego unieruchomieniem. Unieruchomienie może mieć wpływ na fizjologiczne punkty końcowe, takie jak temperatura ciała (hipertermia) lub minutowa pojemność oddechowa. Jeżeli dostępne są dane ogólne, na podstawie których można wykazać, że takie zmiany nie występują w znaczącym stopniu, uprzednia adaptacja do rur unieruchamiających nie jest konieczna. Zwierzęta, których cała powierzchnia ciała jest narażana na działanie aerozolu, w trakcie narażenia powinny być trzymane oddzielnie, aby zapobiec filtrowaniu badanego aerozolu przez futro innych zwierząt w tej samej klatce. Z wyjątkiem okresu narażenia stosowane mogą być konwencjonalne i certyfikowane pasze laboratoryjne oraz umożliwiony nieograniczony dostęp do wody pitnej z instalacji wodociągowej. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności.

▼M4

Komory inhalacyjne

9. Przy wyborze komory inhalacyjnej należy wziąć pod uwagę charakter badanej substancji chemicznej i cel badania. Preferowaną drogą narażenia jest narażenie tylko przez nos (pojęcie to obejmuje narażenie tylko przez głowę, nos lub pysk). Metoda narażenia tylko przez nos jest na ogół preferowana w badaniach aerozoli ciekłych lub stałych oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole. Narażenie całego ciała może lepiej nadawać się do szczególnych celów badania, ale należy to uzasadnić w sprawozdaniu z badania. Aby zagwarantować stabilność atmosfery przy zastosowaniu komory do poddawania narażeniu całego ciała, łączna objętość badanych zwierząt nie powinna przekraczać 5 % objętości komory. Zasady technik narażenia tylko przez nos i przez powierzchnię całego ciała oraz ich szczególne zalety i wady omówiono w GD 39 (2).

BADANIA TOKSYCZNOŚCI

Stężenia graniczne

10. W przeciwieństwie do badań toksyczności ostrej w badaniach toksyczności podprzewlekłej wskutek narażenia inhalacyjnego nie ma określonych stężeń granicznych. Podczas doboru maksymalnego badanego stężenia należy uwzględnić: 1) maksymalne stężenie możliwe do uzyskania; 2) poziom narażenia ludzi w najgorszym przypadku; 3) konieczność utrzymania wystarczającej podaży tlenu; oraz 4) troskę o dobrostan zwierząt. W przypadku braku granic opartych na danych stosowane mogą być granice toksyczności ostrej określone w rozporządzeniu (WE) nr 1272/2008 (13) (tj. do maksymalnego stężenia 5 mg/l dla aerozoli, 20 mg/l dla par i 20 000 ppm dla gazów); zob. GD 39 (2). Jeżeli podczas badania gazów lub wysoce lotnych badanych substancji chemicznych (np. czynników chłodniczych) konieczne jest przekroczenie tych granic, należy podać uzasadnienie. Stężenie graniczne powinno wywoływać wyraźną toksyczność bez powodowania zbędnego stresu dla zwierząt ani wpływania na długość ich życia (3).

Badanie ustalające zakres

11. Przed rozpoczęciem badania głównego na ogół konieczne jest przeprowadzenie badania ustalającego zakres. Badanie ustalające zakres jest bardziej rozległe niż badanie rozpoznawcze, ponieważ nie jest ograniczone do wyboru stężenia. Wiedza zdobyta poprzez badanie ustalające zakres może zadecydować o powodzeniu badania głównego. Badanie ustalające zakres może na przykład dostarczać informacji technicznych na temat metod analitycznych, klasyfikacji cząstek według wielkości, odkrycia mechanizmów toksycznych, danych z zakresu patologii klinicznej i histopatologicznych oraz oszacowań NOAEL i MTC w badaniu głównym. Kierownik badania może postanowić o zastosowaniu badania ustalającego zakres do określenia progu działania drażniącego na drogi oddechowe (np. przy pomocy histopatologii dróg oddechowych, badania czynności płuc lub płukania oskrzelowo-pęcherzykowego), górnego poziomu stężenia, które jest tolerowany bez zbędnego stresu dla zwierząt, oraz parametrów, które najlepiej scharakteryzują toksyczność badanej substancji chemicznej.

12. Badanie ustalające zakres może obejmować jeden poziom stężenia lub większą ich liczbę. Na każdym poziomie stężenia należy poddać narażeniu od trzech do sześciu samców i od trzech do sześciu samic – w zależności od wybranych punktów końcowych. Badanie ustalające zakres powinno trwać co najmniej 5 dni i na ogół nie więcej niż 28 dni. Uzasadnienie wyboru stężeń na potrzeby badania głównego należy podać w sprawozdaniu z badania. Celem badania głównego jest wykazanie zależności stężenie-odpowiedź w oparciu o przewidywany najczulszy punkt końcowy. Najlepiej byłoby, gdyby najniższe stężenie było stężeniem, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, natomiast najwyższe stężenie powinno wywoływać wyraźną toksyczność bez powodowania zbędnego stresu dla zwierząt ani wpływania na długość ich życia (3).

▼M4

13. Przy wyborze poziomów stężenia na potrzeby badania ustalającego zakres należy wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje, w tym zależności struktura-aktywność i dane dotyczące podobnych chemikaliów (zob. pkt 3). W ramach badania ustalającego zakres można zweryfikować/obalić punkty końcowe, które na podstawie modelu mechanistycznego uważa się za najczulsze, np. inhibicję pseudocholinesterazy przez związki fosforoorganiczne, tworzenie methemoglobiny przez związki toksyczne dla erytrocytów, hormony tarczycy (T_3, T_4) w odniesieniu do związków tyreotoksycznych, białka, LDH lub neutrofile w płukaniu oskrzelowo-pęcherzykowym w odniesieniu do nieszkodliwych słabo rozpuszczalnych cząstek lub aerozoli mających działanie drażniące na płuca.

Badanie główne

14. Główne badanie toksyczności podprzewlekłej na ogół obejmuje trzy poziomy stężenia, a także w razie potrzeby równoległe ujemne (poddane działaniu powietrza) grupy kontrolne lub grupy kontrolne nośnika (zob. pkt 18). Wszystkie dostępne dane, w tym wyniki badań toksyczności ogólnoustrojowej, metabolizmu i kinetyki, powinny być wykorzystane jako pomoc w wyborze odpowiednich poziomów narażenia (szczególną uwagę należy zwrócić na unikanie wysokich stężeń, które prowadzą do nasycenia procesów kinetycznych). W skład każdej badanej grupy wchodzi 10 samców i 10 samic gryzoni, które to zwierzęta są narażane na działanie badanej substancji chemicznej przez 6 godzin dziennie 5 dni w tygodniu przez okres 13 tygodni (całkowity czas trwania badania wynosi co najmniej 90 dni). Zwierzęta mogą być również poddawane narażeniu przez 7 dni w tygodniu (np. podczas badania wziewnych produktów farmaceutycznych). Jeśli wiadomo, że jedna płeć jest bardziej podatna na działanie danej badanej substancji chemicznej, płcie mogą być narażane na działanie tej substancji przy różnych poziomach stężenia, aby zoptymalizować zależność stężenie-odpowiedź zgodnie z pkt 15. Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu tylko przez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. W przypadku stosowania okresu narażenia krótszego niż 6 godzin dziennie lub gdy konieczne jest przeprowadzenie badania długotrwałego narażenia całego ciała (np. przez 22 godziny dziennie), należy przedstawić uzasadnienie (zob. GD 39) (2). W okresie narażenia należy zaprzestać podawania zwierzętom paszy, chyba że okres ten przekracza 6 godzin. W trakcie okresu narażenia całego ciała można podawać zwierzętom wodę.

15. Wybrane stężenia docelowe powinny oddziaływać na organy docelowe i wykazywać wyraźną zależność stężenie-odpowiedź:

— wysokie stężenie powinno prowadzić do skutków toksycznych, ale nie powinno powodować przewlekłych objawów lub śmiertelności, które uniemożliwiłyby miarodajną ocenę,

— średnie stężenia powinny być zróżnicowane w celu osiągnięcia stopniowania skutków toksycznych powodowanych przez stężenie niskie i wysokie,

— niskie stężenie nie powinno dawać żadnych objawów toksyczności bądź niewielkie objawy.

Uśmiercanie zwierząt w trakcie trwania doświadczenia

16. Jeżeli planowane jest uśmiercanie zwierząt w trakcie trwania doświadczenia, liczba osobników na każdym poziomie narażenia powinna być powiększona o liczbę zwierząt, którą planuje się uśmiercić przed zakończeniem badania. Należy podać uzasadnienie uśmiercania zwierząt w trakcie trwania doświadczenia oraz należycie uwzględnić te osobniki w analizach statystycznych.

▼M4

Badanie satelitarne (badanie odwracalności)

17. Badanie satelitarne (badanie odwracalności) może być wykorzystywane do obserwacji odwracalności, trwałości lub opóźnionego wystąpienia toksyczności przez odpowiednio długi okres po poddaniu działaniu substancji, jednak przez nie mniej niż 14 dni. Grupy satelitarne (grupy w badaniu odwracalności) składają się z 10 samców i 10 samic poddanych narażeniu równocześnie ze zwierzętami doświadczalnymi w badaniu głównym. Grupy satelitarne (grupy w badaniu odwracalności) powinny być narażone na działanie badanej substancji chemicznej przy najwyższym stężeniu, a w razie potrzeby należy zastosować równoległe poddane działaniu powietrza grupy kontrolne lub grupy kontrolne nośnika (zob. pkt 18).

Zwierzęta z grupy kontrolnej

18. Zwierzęta z równoległej ujemnej (poddanej działaniu powietrza) grupy kontrolnej powinny być traktowane w taki sam sposób jak zwierzęta z grupy badanej, wyjąwszy fakt, że są one narażane na działanie filtrowanego powietrza zamiast badanej substancji chemicznej. W przypadku gdy do ułatwienia wytworzenia atmosfery doświadczalnej stosowana jest woda lub inna substancja, do badania należy włączyć grupę kontrolną nośnika zamiast ujemnej (poddanej działaniu powietrza) grupy kontrolnej. W miarę możliwości wykorzystywanym nośnikiem powinna być woda. Jeżeli w charakterze nośnika używana jest woda, zwierzęta z grupy kontrolnej powinny być narażone na działanie powietrza o takiej samej wilgotności względnej jak grupy narażone na działanie danej substancji. Wybór odpowiedniego nośnika powinien opierać się na właściwie przeprowadzonym badaniu wstępnym lub danych historycznych. Jeżeli toksyczność nośnika nie jest dobrze znana, kierownik badania może postanowić o zastosowaniu zarówno ujemnej (poddanej działaniu powietrza) grupy kontrolnej, jak i grupy kontrolnej nośnika, lecz jest to zdecydowanie odradzane. Jeśli dane historyczne wskazują na to, że nośnik jest nietoksyczny, nie ma potrzeby stosowania ujemnej (poddanej działaniu powietrza) grupy kontrolnej i należy jedynie wykorzystać grupę kontrolną nośnika. Jeśli badanie wstępne badanej substancji chemicznej zawartej w nośniku nie wskazuje na toksyczność, wynika z tego, że dany nośnik jest nietoksyczny przy badanym stężeniu i że należy zastosować grupę kontrolną tego nośnika.

WARUNKI NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Stosowanie stężeń

19. Zwierzęta są narażane na działanie badanej substancji chemicznej w postaci gazu, pary, aerozolu lub ich mieszaniny. Stan fizyczny, który ma być przedmiotem badania, zależy od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, wybranych stężeń lub formy fizycznej, która najprawdopodobniej będzie występować podczas postępowania z badaną substancją chemiczną i jej stosowania. Substancje chemiczne o charakterze higroskopijnym oraz chemicznie reaktywne należy badać w suchej atmosferze. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć osiągnięcia stężenia wybuchowego. Cząstki stałe można poddawać procesom mechanicznym w celu zmniejszenia wielkości cząstek. Dalsze wytyczne przedstawiono w GD 39 (2).

Rozkład wielkości cząstek

20. W odniesieniu do wszystkich aerozoli oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole, należy dokonać klasyfikacji cząstek według wielkości. W celu umożliwienia narażenia wszystkich odpowiednich części dróg oddechowych na działanie danej substancji zalecane są aerozole o średnicy aerodynamicznej mediany rozkładu masowego (MMAD) wynoszącej od 1 do 3 μm przy geometrycznym standardowym odchyleniu (σ_g) równym od 1,5 do 3,0 (4). Należy dołożyć uzasadnionych starań, aby spełnić tę normę, jednak w razie niemożności jej osiągnięcia trzeba przedstawić specjalistyczną opinię. Na przykład cząstki par metali będą mniejsze od tej normy, a naładowane cząstki i włókna mogą ją przekraczać.

▼M4

Przygotowywanie badanej substancji chemicznej w nośniku

21. Najlepiej byłoby, gdyby badana substancja chemiczna była analizowana bez nośnika. Jeżeli w celu osiągnięcia odpowiedniego stężenia i wielkości cząstek badanej substancji chemicznej konieczne jest stosowanie nośnika, preferowanym nośnikiem powinna być woda. Zawsze kiedy badana substancja chemiczna jest rozpuszczona w nośniku, należy wykazać jej stabilność.

MONITOROWANIE WARUNKÓW NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Przepływ powietrza w komorze

22. Przepływ powietrza przez komorę inhalacyjną powinien być dokładnie kontrolowany, monitorowany w sposób ciągły i rejestrowany przynajmniej co godzinę podczas każdego narażenia. Monitorowanie w czasie rzeczywistym stężenia (lub jego czasowej stabilności) badanej substancji w atmosferze doświadczalnej jest całościowym pomiarem wszystkich parametrów dynamicznych i stanowi pośredni sposób kontrolowania wszystkich istotnych dynamicznych parametrów inhalacyjnych. Jeśli stężenie jest monitorowane w czasie rzeczywistym, częstotliwość pomiaru przepływu powietrza może być zmniejszona do jednego pomiaru dziennie na narażenie. Szczególną uwagę należy zwrócić na unikanie ponownego wdychania w komorach służących do narażania tylko przez nos. Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 19 %, a stężenie dwutlenku węgla nie powinno przekraczać 1 %. Jeżeli istnieją powody, by przypuszczać, że norma ta nie może zostać osiągnięta, należy mierzyć stężenia tlenu i dwutlenku węgla. Jeśli w pierwszym dniu narażenia pomiary wykażą, że stężenia tych gazów są odpowiednie, dalsze pomiary nie powinny być konieczne.

Temperatura i wilgotność względna w komorze

23. Temperatura w komorze powinna być utrzymywana na poziomie 22 ± 3 °C. Wilgotność względna w strefie oddychania zwierząt powinna być stale monitorowana i rejestrowana co godzinę podczas każdego narażenia, jeżeli to możliwe, zarówno w przypadku narażenia tylko przez nos, jak i narażenia całego ciała. Wilgotność względna powinna być utrzymywana w przedziale od 30 do 70 %, lecz może to być albo nieosiągalne (np. przy badaniu mieszanin na bazie wody), albo niemierzalne z powodu interferencji badanej substancji chemicznej z metodą badawczą.

Badana substancja chemiczna: stężenie nominalne

24. Stężenie nominalne w komorze inhalacyjnej powinno być obliczane i rejestrowane, gdy tylko jest to możliwe. Stężenie nominalne to masa wprowadzonej badanej substancji chemicznej podzielona przez całkowitą objętość powietrza przepuszczonego przez system komory inhalacyjnej. Stężenie nominalne nie służy do charakteryzowania narażenia zwierząt, lecz porównanie stężenia nominalnego i stężenia rzeczywistego umożliwia określenie w przybliżeniu efektywności układu badawczego, a tym samym może być używane do wykrywania problemów z funkcjonowaniem tego układu.

Badana substancja chemiczna: stężenie rzeczywiste

25. Stężenie rzeczywiste to stężenie badanej substancji chemicznej w próbkach pobranych w strefie oddychania zwierząt w komorze inhalacyjnej. Stężenie rzeczywiste można obliczyć za pomocą metod specyficznych (np. bezpośredniego pobierania próbek, metod adsorpcyjnych lub z wykorzystaniem reaktywności chemicznej, a następnie charakterystyki analitycznej) lub metod niespecyficznych, takich jak analiza grawimetryczna przy zastosowaniu filtra. Zastosowanie metody grawimetrycznej jest dopuszczalne tylko w przypadku jednoskładnikowych aerozoli proszkowych lub aerozoli cieczy

▼M4

o niskiej lotności i powinno być poparte odpowiednią charakterystyką badanej substancji chemicznej opracowaną przed badaniem. Stężenie wieloskładnikowego aerozolu proszkowego także można określić za pomocą metody grawimetrycznej. Wymaga to jednak danych analitycznych, które dowodzą, że skład materiału w powietrzu jest podobny do materiału wyjściowego. Jeśli te informacje nie są dostępne, konieczna może być ponowna analiza badanej substancji chemicznej (najlepiej w stanie zawieszonym w powietrzu) w regularnych odstępach czasu w trakcie trwania badania. W przypadku środków w aerozolu, które mogą parować lub sublimować, należy wykazać, że wszystkie fazy zebrano przy użyciu wybranej metody.

26. O ile to możliwe, przez cały czas trwania badania należy używać jednej partii badanej substancji chemicznej, a badana próbka powinna być przechowywana w warunkach zapewniających zachowanie jej czystości, jednorodności i stabilności. Przed rozpoczęciem badania należy scharakteryzować badaną substancję chemiczną, w tym określić jej czystość oraz, jeżeli jest to technicznie możliwe, tożsamość i ilości zidentyfikowanych domieszek i zanieczyszczeń. Można to przedstawić m.in. za pomocą następujących danych: czasu retencji i względnej powierzchni sygnału, masy cząsteczkowej uzyskanej w drodze spektrometrii masowej lub chromatografii gazowej bądź innych oszacowań. Mimo że oznaczenie tożsamości badanej próbki nie należy do obowiązków laboratorium badawczego, rozsądne może być potwierdzenie przez to laboratorium charakterystyki, którą przedstawił sponsor, przynajmniej w ograniczonym zakresie (np. co do koloru, cech fizycznych itp.).

27. Podczas badania należy utrzymywać możliwie niezmienną atmosferę. W celu wykazania stabilności warunków narażenia można wykorzystać urządzenie umożliwiające monitorowanie w czasie rzeczywistym, takie jak fotometr w przypadku aerozoli lub analizator węglowodorów całkowitych w przypadku par. Stężenie rzeczywiste w komorze powinno być mierzone co najmniej 3 razy w ciągu każdego dnia narażenia dla każdego poziomu narażenia. Jeśli nie jest to możliwe ze względu na ograniczone natężenie przepływu powietrza lub niskie stężenie, dopuszczalne jest pobieranie jednej próbki na okres narażenia. Najlepiej byłoby, gdyby w takim przypadku próbka była pobierana przez cały okres narażenia. Wartości stężeń w komorze dla poszczególnych próbek nie powinny odbiegać od średniego stężenia w komorze o więcej niż ± 10 % dla gazów i par oraz o więcej niż ± 20 % dla aerozoli ciekłych lub stałych. Należy obliczyć i podać okres wyrównania stężeń w komorze (t_{95}). Czas trwania narażenia obejmuje czas wprowadzania badanej substancji chemicznej do komory. Uwzględnia się w tym okres wyrównania stężeń w komorze (t_{95}) i czas rozpadu. Wytyczne dotyczące szacowania t_{95} można znaleźć w GD 39 (2).

28. W przypadku bardzo złożonych mieszanin składających się z gazów/par i aerozoli (np. w przypadku atmosfery spalania i badanych substancji chemicznych wydzielanych ze specjalnych produktów/urządzeń do zastosowania końcowego) każda faza może zachowywać się inaczej w komorze inhalacyjnej. W związku z tym należy wybrać co najmniej jedną substancję wskaźnikową (analit) każdej fazy (gaz/pary i aerozol), zwykle główny składnik aktywny w mieszaninie. Jeżeli badana substancja chemiczna jest mieszaniną, należy podać stężenie analityczne w odniesieniu do całej mieszaniny, a nie tylko składnika aktywnego lub substancji wskaźnikowej (analitu). Dodatkowe informacje na temat stężeń rzeczywistych można znaleźć w GD 39 (2).

Badana substancja chemiczna: rozkład wielkości cząstek

29. Rozkład wielkości cząstek aerozoli należy określać co najmniej raz w tygodniu w odniesieniu do każdego poziomu stężenia za pomocą impaktora kaskadowego lub innego instrumentu takiego jak aerodynamiczny spektrometr pomiaru cząstek. Jeżeli można wykazać równoważność wyników uzyskanych za pośrednictwem impaktora kaskadowego i innego instrumentu, to ten inny instrument może być stosowany przez cały okres badania.

▼M4

30. W celu potwierdzenia sprawności zatrzymywania cząstek przez instrument główny należy równolegle do tego instrumentu stosować drugie urządzenie, takie jak filtr grawimetryczny lub odpylacz/bełkotka. Stężenie masowe uzyskane na podstawie analizy wielkości cząstek powinno mieścić się w rozsądnych granicach stężenia masowego uzyskanego poprzez analizę filtrów [zob. GD 39 (2)]. Dalsze pomiary potwierdzające można pominąć, jeśli można wykazać równoważność w odniesieniu do wszystkich stężeń badanych w początkowej fazie badania. Ze względu na dobrostan zwierząt należy podjąć środki mające na celu zminimalizowanie ilości danych niejednoznacznych, które mogą spowodować konieczność powtórzenia badania.

31. Klasyfikację cząstek według wielkości należy przeprowadzić w odniesieniu do par, jeżeli istnieje jakakolwiek możliwość tworzenia się aerozolu wskutek kondensacji par lub jeśli cząstki są wykrywane w atmosferze parowej mającej potencjał tworzenia faz mieszanych.

OBSERWACJE

32. Zwierzęta powinny być poddane obserwacji klinicznej przed okresem narażenia, w jego trakcie i po nim. W zależności od reakcji zwierząt podczas narażenia wskazane może być częstsze dokonywanie obserwacji. Jeżeli obserwacja zwierząt jest utrudniona wskutek zastosowania rur unieruchamiających zwierzęta, słabo oświetlonych komór do narażania całego ciała lub nieprzejrzystości powietrza, zwierzęta powinny być uważnie obserwowane po narażeniu. W ramach obserwacji przed kolejnym dniem narażenia można ocenić odwracalność lub nasilenie skutków toksycznych.

33. Wszystkie obserwacje są systematycznie zapisywane, przy czym w odniesieniu do każdego zwierzęcia prowadzone są indywidualne rejestry. W przypadku uśmiercenia zwierząt z przyczyn humanitarnych lub stwierdzenia u nich zgonu należy możliwie jak najdokładniej zapisać czas zgonu.

34. Obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować zmiany skóry i sierści, oczu i błon śluzowych; zmiany w układzie oddechowym i układzie krążenia; zmiany w układzie nerwowym oraz zmiany w aktywności somatycznej i sposobie zachowania. Należy poświęcić uwagę obserwacjom drżenia, konwulsji, ślinotoku, biegunki, letargu, snu i śpiączki. Pomiar temperatury w odbycie może dostarczyć dodatkowych dowodów odruchowego spowolnienia oddechu lub hipo-/hipertermii w związku z poddawaniem działaniu substancji lub przetrzymywaniem w zamknięciu. W protokole badania można uwzględnić dodatkowe oceny, takie jak dotyczące: kinetyki, biomonitoringu, czynności płuc, zatrzymywania słabo rozpuszczalnych substancji, które gromadzą się w tkance płuc, oraz zmian w zachowaniu.

MASA CIAŁA

35. Masę ciała poszczególnych zwierząt należy odnotować tuż przed pierwszym narażeniem (dzień 0), następnie dwa razy w tygodniu (na przykład w piątki i poniedziałki, aby wykazać zdrowienie przez weekend, kiedy nie dochodzi do narażenia, lub w odstępach czasu pozwalających na ocenę toksyczności ogólnoustrojowej) oraz w chwili zgonu lub eutanazji. Jeżeli w ciągu pierwszych 4 tygodni nie wystąpią żadne skutki, przez pozostały czas badania masę ciała można mierzyć co tydzień. Zwierzęta z grupy satelitarnej (grupy w badaniu odwracalności) (jeżeli są wykorzystywane) należy ważyć co tydzień przez cały okres zdrowienia. Na koniec badania wszystkie zwierzęta należy zważyć tuż przed uśmierceniem, aby umożliwić obiektywne obliczenie stosunku masy poszczególnych organów do masy ciała.

SPOŻYCIE POKARMU I WODY

36. Spożycie pokarmu należy mierzyć raz w tygodniu. Spożycie wody również można mierzyć.

▼M4

PATOLOGIA KLINICZNA

37. Oceny z zakresu patologii klinicznej należy przeprowadzać dla wszystkich zwierząt, w tym zwierząt z grupy satelitarnej (grupy w badaniu odwracalności), gdy są one uśmiercane. Należy odnotować odstęp czasu pomiędzy zakończeniem narażenia a pobraniem krwi, szczególnie gdy odtworzenie danego punktu końcowego jest szybkie. Pobranie próbek po zakończeniu narażenia wskazane jest w przypadku tych parametrów, które charakteryzują się krótkim okresem półtrwania w osoczu (np. COHb, CHE i MetHb).

38. Tabela 1 zawiera wykaz parametrów analizy patologicznej, które są na ogół wymagane we wszystkich badaniach toksykologicznych. Badanie moczu nie jest wymagane jako badanie rutynowe, lecz może być wykonane, gdy zostanie to uznane za przydatne na podstawie spodziewanej lub obserwowanej toksyczności. Kierownik badania może postanowić o ocenie dodatkowych parametrów, aby lepiej scharakteryzować toksyczność badanej substancji chemicznej (np. pseudocholinesterazy, lipidów, hormonów, równowagi kwasowo-zasadowej, methemoglobiny lub ciałek Heinza, kinazy kreatynowej, stosunku komórek mieloidalnych do erytroidalnych, troponiny, gazów krwi tętniczej, dehydrogenazy mleczanowej, dehydrogenazy sorbitolowej, dehydrogenazy glutaminianowej oraz gamma-glutamylotranspeptydazy).

Tabela 1

Standardowe parametry analizy patologicznej

Hematologia	
Liczba czerwonych krwinek	Całkowita liczba leukocytów
Hematokryt	Różnicowa liczba leukocytów
Stężenie hemoglobiny	Liczba płytek krwi
Średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej	Krzepliwość (wybrać jedną opcję):
Średnia objętość krwinki czerwonej	— Czas protrombinowy
Średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej	— Czas krzepnięcia
Retikulocyty	— Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji
Chemia kliniczna	
Glukoza (*)	Aminotransferaza alaninowa
Cholesterol całkowity	Aminotransferaza asparaginianowa
Trójglicerydy	Fosfataza alkaliczna
Azot mocznikowy we krwi	Potas
Bilirubina całkowita	Sód
Kreatynina	Wapń
Białko całkowite	Fosfor
Albumina	Chlorek
Globulina	
Badanie moczu (opcjonalne)	
Wygląd (barwa i mętność)	Białko całkowite
Objętość	Glukoza
Ciężar właściwy lub osmolalność	Krew/komórki krwi
pH	

(*) Ponieważ długi okres wstrzymywania podawania pokarmu może prowadzić do błędów systematycznych w pomiarach glukozy u zwierząt poddawanych działaniu substancji w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej, kierownik badania powinien zdecydować, czy wstrzymanie karmienia zwierząt jest właściwe. Jeżeli stosowane jest wstrzymanie podawania pokarmu, jego okres powinien być odpowiedni dla wykorzystywanych gatunków zwierząt; w przypadku szczura może to być 16 h (niekarmienie przez noc). Oznaczenie glukozy na czczo można przeprowadzić po wstrzymaniu podawania pożywienia przez całą noc w ciągu ostatniego tygodnia narażenia lub po całonocnym niekarmieniu przed sekcją zwłok (w tym ostatnim przypadku wraz z pomiarem wszystkich innych parametrów analizy patologicznej).

▼M4

39. Jeżeli istnieją dowody na to, że dolne drogi oddechowe (tj. pęcherzyki płucne) są głównym miejscem osadzania się i zatrzymywania danej substancji, preferowaną techniką ilościowej analizy hipotetycznych parametrów efektu dawki związanych z zapaleniem pęcherzyków płucnych, zapaleniem płuc i fosfolipidozą może być płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe. Umożliwia to właściwe zbadanie zależności dawka-odpowiedź i zmian uszkodzeń pęcherzyków płucnych w funkcji czasu. Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe można badać pod kątem całkowitej i różnicowej liczby leukocytów, białka całkowitego oraz dehydrogenazy mleczanowej. Innymi parametrami, które można wziąć pod uwagę, są te, które wskazują na uszkodzenia lizosomów, fosfolipidozę, zwłóknienie oraz stan zapalny wskutek podrażnienia lub stan alergiczny, który może wymagać oznaczenia cytokin/chemokin prozapalnych. Pomiary popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych na ogół uzupełniają wyniki badań histopatologicznych, lecz nie mogą ich zastępować. Wytyczne dotyczące przeprowadzania płukania oskrzelowo-pęcherzykowego można znaleźć w GD 39 (2).

BADANIE OFTALMOLOGICZNE

40. Badania oftalmologiczne dna oka, refrakcji, tęczówki i spojówki powinny być przeprowadzane za pomocą oftalmoskopu lub równoważnego urządzenia u wszystkich zwierząt przed podaniem badanej substancji chemicznej, a w przypadku wszystkich grup otrzymujących wysokie stężenie substancji i kontrolnych na zakończenie badania. W przypadku wykrycia zmian w oczach należy przebadać wszystkie zwierzęta w pozostałych grupach, w tym w grupie satelitarnej (grupie w badaniu odwracalności).

WYRAŹNE ZMIANY PATOLOGICZNE I MASA ORGANÓW

41. Wszystkie badane zwierzęta, w tym te, które padły podczas badania lub zostały wyeliminowane z badania ze względu na ich dobrostan, powinny zostać poddane całkowitemu wykrwawieniu (jeżeli to możliwe) i pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu. Należy odnotować czas pomiędzy zakończeniem ostatniego narażenia każdego zwierzęcia a jego uśmierceniem. Jeżeli sekcji zwłok nie można przeprowadzić natychmiast po znalezieniu martwego zwierzęcia, zwierzę należy schłodzić (nie zamrozić) do temperatury wystarczająco niskiej do zminimalizowania autolizy. Sekcję zwłok należy przeprowadzić możliwie szybko, zwykle w ciągu dnia lub dwóch. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy zarejestrować wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne ze szczególnym uwzględnieniem wszelkich zmian w drogach oddechowych.

42. Tabela 2 zawiera wykaz organów i tkanek, które należy zachować w odpowiednim środku w trakcie pełnego rozpoznania histopatologicznego na potrzeby badania histopatologicznego. Organy i tkanki **[**wymienione w nawiasach kwadratowych**]** oraz wszelkie inne organy i tkanki można zachować według uznania kierownika badania. Organy wymienione **czcionką pogrubioną** należy okroić i zważyć w stanie wilgotnym niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji w celu uniknięcia wyschnięcia. Tarczycę i najądrza należy zważyć wyłącznie wówczas, gdy jest to konieczne, ponieważ okrajanie artefaktów może utrudnić ocenę histopatologiczną. Tkanki i organy należy utrwalić w 10 % roztworze buforowanej formaliny lub innej odpowiedniej substancji utrwalającej niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji zwłok i nie później niż na 24–48 godzin przed okrojeniem, w zależności od stosowanej substancji utrwalającej.

▼M4

Tabela 2

Organy i tkanki zachowywane w trakcie pełnego rozpoznania histopatologicznego

Nadnercza	Przełyk
Aorta	[Opuszka węchowa]
Szpik kostny (lub świeży aspirat)	**Jajniki**
Mózg (w tym wycinki kresomózgowia, móżdżku i rdzenia/mostu)	Trzustka
Jelito ślepe	Przytarczyce
Okrężnica	Nerw obwodowy (kulszowy lub piszczelowy, najlepiej blisko mięśnia)
Dwunastnica	Przysadka
[Najądrza]	Prostata
[Oczy (siatkówka, nerw wzrokowy) i powieki]	Odbytnica
Kość udowa i staw kolanowy	Gruczoły ślinowe
Woreczek żółciowy (jeżeli występuje)	Pęcherzyki nasienne
[Gruczoły przyoczne]	Skóra
Serce	Rdzeń kręgowy (odcinek szyjny, śródpiersiowy i lędźwiowy)
Jelito kręte	**Śledziona**
Jelito czcze	Mostek
Nerki	Żołądek
[Gruczoły łzowe (zewnątrzoczodołowe)]	Zęby
Krtań (3 poziomy, w tym podstawa nagłośni)	**Jądra**
Wątroba	**Grasica**
Płuco (wszystkie płaty na jednym poziomie, w tym oskrzela główne)	**Tarczyca**
Węzły chłonne z okolicy wnęki płuca, szczególnie w przypadku badań słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych mających postać cząstek stałych. Na potrzeby bardziej pogłębionych badań lub badań immunologicznych można wziąć pod uwagę dodatkowe węzły chłonne, np. z części śródpiersiowej, szyjnej/podżuchwowej lub usznej	[Język]
	Tchawica (co najmniej 2 wycinki, w tym 1 wycinek pobrany podłużnie poprzez ostrogę i 1 wycinek pobrany poprzecznie)
	[Moczowód]
Węzły chłonne (dystalne w stosunku do wrót zakażenia)	[Cewka moczowa]
Gruczoł mlekowy (u samic)	Pęcherz moczowy
Mięsień (udo)	**Macica**
Tkanki nosogardła (co najmniej 4 poziomy; 1 poziom ma obejmować przewód nosowo-gardłowy i tkankę limfatyczną związaną ze śluzówką nosa (NALT))	Organy docelowe
	Wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne i masy

▼M4

43. Płuca należy usunąć w stanie nienaruszonym, zważyć i zaaplikować odpowiednią substancję utrwalającą pod ciśnieniem 20–30 cm wody celem zapewnienia utrzymania ich struktury (5). Wycinki należy pobrać dla wszystkich płatów na jednym poziomie, w tym z oskrzeli głównych, lecz w przypadku przeprowadzania płukania oskrzelowo-pęcherzykowego z nieprzepłukanego płatu należy pobrać wycinki na trzech poziomach (nie szeregowo).

44. Należy zbadać co najmniej 4 poziomy tkanek nosogardła, z których jeden powinien obejmować przewód nosowo-gardłowy (5) (6) (7) (8) (9), aby umożliwić odpowiednie zbadanie nabłonka płaskiego, przejściowego (oddechowego nieurzęsionego), oddechowego (oddechowego urzęsionego) i węchowego, a także tkanki limfatycznej związanej ze śluzówką nosa (NALT) (10) (11). Należy zbadać trzy poziomy krtani, a jeden z tych poziomów powinien obejmować podstawę nagłośni (12). Należy zbadać co najmniej dwa poziomy tchawicy, w tym pobrać jeden wycinek pobrany podłużnie przez ostrogę rozgałęzienia oskrzeli pozapłucnych i jeden wycinek pobrany poprzecznie.

HISTOPATOLOGIA

45. Ocenę histopatologiczną wszystkich organów i tkanek wymienionych w tabeli 2 należy przeprowadzić w odniesieniu do grupy kontrolnej i grupy otrzymującej wysokie stężenie substancji, a także wszystkich zwierząt, które padły lub zostały uśmiercone podczas badania. Szczególną uwagę należy zwrócić na drogi oddechowe, organy docelowe i makroskopowe zmiany patologiczne. Organy i tkanki zwierząt z grupy otrzymującej wysokie stężenie substancji, w których stwierdzono zmiany patologiczne, należy zbadać we wszystkich grupach. Kierownik badania może postanowić o przeprowadzeniu ocen histopatologicznych dodatkowych grup, aby wykazać wyraźną zależność stężenie-odpowiedź. Jeśli używa się grupy satelitarnej (grupy w badaniu odwracalności), należy przeprowadzić ocenę histopatologiczną wszystkich tkanek i organów, w których stwierdzono skutki podania substancji w grupach otrzymujących substancję badaną. W przypadku występowania nadmiernej liczby wczesnych zgonów lub innych problemów w grupie poddawanej wysokiemu narażeniu, które negatywnie wpływają na istotność danych, badania histopatologiczne należy przeprowadzić w grupie otrzymującej daną substancję o kolejnym, niższym stężeniu. Należy podjąć próbę skorelowania wyników całości obserwacji z wynikami badań mikroskopowych.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

46. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy przedstawić dane dotyczące masy ciała, spożycia pokarmu, patologii klinicznej, wyraźnych zmian patologicznych, masy organów i histopatologii. Dane z obserwacji klinicznych należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę wykorzystanych zwierząt, liczbę zwierząt wykazujących specyficzne oznaki toksyczności, liczbę zwierząt padłych w trakcie trwania badania lub uśmierconych z przyczyn humanitarnych, czas zgonu poszczególnych zwierząt, opis skutków toksycznych oraz ich przebieg w czasie i odwracalność, a także wyniki sekcji zwłok. Wszystkie wyniki ilościowe i dodatkowe należy ocenić za pomocą właściwej metody statystycznej. Można zastosować dowolną ogólnie przyjętą metodę statystyczną, przy czym wyboru metod statystycznych należy dokonać podczas przygotowywania projektu badania.

Sprawozdanie z badania

47. Sprawozdanie z badania powinno w stosownych przypadkach zawierać następujące informacje:

Badane zwierzęta i ich hodowla

— opis warunków przetrzymywania w klatkach, w tym: liczba (lub zmiana liczby) zwierząt na klatkę, ściółka, temperatura otoczenia i wilgotność względna, fotoperiod i określenie diety,

▼M4

— wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie zastosowania gatunków innych niż szczur. Można przedstawić źródło i dane historyczne, jeżeli dotyczą one zwierząt poddanych podobnemu narażeniu oraz warunkom przebywania i żywieniowym,

— liczba, wiek i płeć zwierząt,

— metoda randomizacji,

— opis wszelkich przygotowań przed badaniem, w tym diety, kwarantanny i leczenia chorób.

Badana substancja chemiczna

— cechy fizyczne, czystość oraz w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (w tym izomeryzacja),

— dane identyfikacyjne i numer w rejestrze Chemical Abstract Services (CAS), jeżeli jest znany.

Nośnik

— uzasadnienie zastosowania nośnika oraz uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda),

— dane historyczne lub równoległe, wykazujące, że nośnik nie zakłóca wyniku badania.

Komora inhalacyjna

— szczegółowy opis komory inhalacyjnej, w tym jej rozmiary i schemat,

— źródło i opis wyposażenia wykorzystywanego do celów narażenia, jak również do wytwarzania atmosfery,

— wyposażenie do pomiaru temperatury, wilgotności, rozmiaru cząstek i stężenia rzeczywistego,

— źródło powietrza i system klimatyzacji,

— metody kalibracji wyposażenia w celu zapewnienia jednorodnej atmosfery na potrzeby badania,

— różnica ciśnienia (dodatnia lub ujemna),

— porty narażenia w komorze (narażenie tylko przez nos); lokalizacja zwierząt w komorze (narażenie całego ciała),

— stabilność atmosfery doświadczalnej,

— lokalizacja czujników temperatury i wilgotności oraz pobieranie próbek powietrza w komorze,

— oczyszczanie dostarczanego/odprowadzanego powietrza,

— natężenie przepływu powietrza, natężenie przepływu powietrza/port narażenia (narażenie tylko przez nos) lub ładunek zwierząt/komorę (narażenie całego ciała),

— okres wyrównania stężeń w komorze inhalacyjnej (t_{95}),

— liczba zmian objętości na godzinę,

— urządzenia pomiarowe (w stosownych przypadkach).

Dane dotyczące narażenia

— uzasadnienie wyboru docelowego stężenia w badaniu głównym,

▼M4

— stężenia nominalne (całkowita masa badanej substancji chemicznej wprowadzonej do komory inhalacyjnej podzielona przez objętość powietrza przepuszczonego przez komorę),

— rzeczywiste stężenia badanej substancji chemicznej w próbkach ze strefy oddychania zwierząt; w przypadku mieszanin, które tworzą heterogeniczne formy fizyczne (gazy, pary, aerozole), każdą substancję można przeanalizować oddzielnie,

— wszystkie stężenia substancji w powietrzu należy podawać w jednostkach masy (mg/l, mg/m^3 itd.), a nie w jednostkach objętości (ppm, ppb itd.),

— rozkład wielkości cząstek, średnica aerodynamiczna mediany rozkładu masowego (MMAD) oraz geometryczne standardowe odchylenie (σ_g), w tym metody ich obliczania. Należy odnotować poszczególne analizy wielkości cząstek.

Warunki badania

— szczegółowe informacje na temat przygotowania badanej substancji chemicznej, w tym szczegóły dotyczące wszelkich procedur zastosowanych w celu zmniejszenia rozmiaru cząstek ciał stałych lub przygotowania roztworów badanej substancji chemicznej,

— opis (najlepiej wraz ze schematem) wyposażenia wykorzystywanego do wytworzenia atmosfery na potrzeby badania i narażania zwierząt na jej działanie,

— szczegółowe informacje na temat wyposażenia stosowanego do monitorowania temperatury, wilgotności i przepływu powietrza w komorze (tj. opracowanie krzywej kalibracyjnej),

— szczegółowe informacje na temat wyposażenia stosowanego do pobierania próbek na potrzeby określenia stężenia w komorze i rozkładu wielkości cząstek,

— szczegółowe informacje na temat zastosowanej metody analizy chemicznej oraz walidacji metody (w tym wydajność odzysku badanej substancji chemicznej ze środka do pobierania próbek),

— metoda randomizacji przypisywania zwierząt do grupy badanej i grupy kontrolnej,

— szczegółowe informacje na temat jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety oraz źródło wody),

— uzasadnienie wyboru badanych stężeń.

Wyniki

— tabelaryczne zestawienie temperatury, wilgotności i przepływu powietrza w komorze,

— tabelaryczne zestawienie danych dotyczących nominalnego i rzeczywistego stężenia w komorze,

— tabelaryczne zestawienie danych dotyczących rozmiaru cząstek, w tym danych dotyczących gromadzenia próbek analitycznych, rozkładu wielkości cząstek oraz obliczenia MMAD i σ_g,

— tabelaryczne zestawienie danych dotyczących reakcji i poziomu stężenia dla każdego zwierzęcia (tj. zwierząt wykazujących oznaki toksyczności, w tym śmiertelność, rodzaj, ostrość, czas pojawienia się i czas trwania objawów),

▼M4

— tabelaryczne zestawienia masy poszczególnych zwierząt,

— tabelaryczne zestawienia spożycia pokarmu,

— tabelaryczne zestawienie danych z zakresu patologii klinicznej,

— wyniki sekcji zwłok oraz badań histopatologicznych w odniesieniu do każdego zwierzęcia, jeżeli są dostępne.

Omówienie i interpretacja wyników

— szczególny nacisk należy położyć na opis metod zastosowanych w celu spełnienia kryteriów niniejszej metody badawczej, np. dotyczących stężenia granicznego lub rozmiaru cząstek,

— należy uwzględnić respirabilność cząstek w świetle wyników ogólnych, szczególnie jeżeli nie można było spełnić kryterium rozmiaru cząstek,

— w ogólnej ocenie badania należy uwzględnić spójność metod zastosowanych w celu określenia nominalnego i rzeczywistego stężenia oraz relacji między stężeniem rzeczywistym a nominalnym,

— należy uwzględnić prawdopodobną przyczynę zgonu i dominujący sposób działania (ogólnoustrojowy w porównaniu z miejscowym),

— należy przedstawić wyjaśnienie, jeżeli zaistniała konieczność humanitarnego uśmiercenia zwierząt wykazujących oznaki bólu lub objawy ostrego i przewlekłego stresu, zgodnie z kryteriami zawartymi w wytycznych OECD dotyczących humanitarnego punktu końcowego (3),

— należy określić organy docelowe,

— należy określić NOAEL i LOAEL.

BIBLIOGRAFIA:

(1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, pierwotna wersja dotyczącej badań wytycznej OECD nr 413, Dyrekcja ds. Środowiska, OECD, Paryż.

(2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment nr 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paryż.

(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 nr 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paryż.

(4) Whalan E i Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Biuro ds. Programów Stosowania Pestycydów, Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (rozdział 9) w: *Toxicology of Inhaled Material*, Witschi, H.P. i Brain, J.D. (red.), Springer Verlag Heidelberg, s. 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. W: Waalkes MP i Ward JM (red.) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, Nowy Jork, 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, Art. 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) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1).

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICJA

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M4

B.30. **BADANIA TOKSYCZNOŚCI PRZEWLEKŁEJ**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 452 (OECD TG 452) (2009). Pierwotną TG nr 452 przyjęto w 1981 r. Opracowanie niniejszej zmienionej metody badawczej B.30 uznano za konieczne w celu odzwierciedlenia ostatnich zmian w dziedzinie dobrostanu zwierząt i wymogów regulacyjnych (1) (2) (3) (4). Aktualizację niniejszej metody badawczej B.30 przeprowadzono równolegle z zmianami rozdziału B.32 niniejszego załącznika, dotyczącego badań rakotwórczości, oraz rozdziału B.33 niniejszego załącznika, dotyczącego łączonych badań toksyczności przewlekłej/rakotwórczości, w celu uzyskania dodatkowych informacji na podstawie zwierząt wykorzystanych w badaniu oraz w celu zapewnienia dalszych szczegółowych informacji na temat doboru dawek. Niniejszą metodę badawczą opracowano w celu jej wykorzystywania w badaniach szerokiego zakresu chemikaliów, w tym pestycydów i chemikaliów przemysłowych.

2. Większość badań toksyczności przewlekłej przeprowadza się z wykorzystaniem gatunków gryzoni, w związku z czym niniejsza metoda badawcza przewidziana jest do stosowania przede wszystkim w badaniach z wykorzystaniem takich gatunków. W razie konieczności przeprowadzenia takich badań z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie można także zastosować zasady i procedury określone w niniejszej metodzie badawczej, przy wprowadzeniu odpowiednich modyfikacji, wraz z zasadami i procedurami określonymi w rozdziale B.27 niniejszego załącznika, dotyczącym 90-dniowego badania toksyczności pokarmowej wywołanej powtarzanym dawkowaniem z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie (5), zgodnie z wytycznymi OECD nr 116 dotyczącymi opracowywania i przeprowadzania badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (6).

3. Trzy główne drogi podania stosowane w badaniach toksyczności przewlekłej to droga pokarmowa, dermalna i inhalacyjna. Wybór drogi podania zależy od fizycznych i chemicznych właściwości badanej substancji chemicznej oraz głównej drogi narażenia ludzi. Dodatkowe informacje na temat wyboru drogi narażenia przedstawiono w wytycznych OECD nr 116 (6).

4. W ramach niniejszej metody badawczej kładzie się nacisk na narażenie drogą pokarmową, która jest drogą najczęściej stosowaną w badaniach toksyczności przewlekłej. Przeprowadzenie długoterminowych badań obejmujących narażenie drogą dermalną lub inhalacyjną może być również konieczne do oceny ryzyka dla zdrowia ludzi lub wymagane w ramach pewnych systemów regulacji, jednak obydwie te drogi narażenia wymagają badań bardzo złożonych technicznie. Takie badania będą musiały zostać opracowane dla poszczególnych przypadków, jednak opisana w niniejszym rozdziale metoda badawcza mająca na celu ocenę i oszacowanie toksyczności przewlekłej przy pokarmowej drodze podania może stanowić podstawę dla protokołu badania z zastosowaniem inhalacyjnej lub dermalnej drogi podania, z zastrzeżeniem zaleceń dotyczących okresów poddawania działaniu substancji, parametrów klinicznych, parametrów analizy patologicznej itp. Dostępne są wytyczne OECD dotyczące podawania badanych substancji chemicznych drogą inhalacyjną (6) (7) i drogą dermalną (6). Podczas opracowywania badań uwzględniających dłuższy okres narażenia drogą inhalacyjną należy w szczególności wziąć pod uwagę rozdział B.8 niniejszego załącznika (8) oraz rozdział B.29 niniejszego załącznika (9), a także wytyczne OECD dotyczące badania ostrej toksyczności inhalacyjnej (7). W przypadku badań przeprowadzanych drogą dermalną należy uwzględnić rozdział B.9 niniejszego załącznika (10).

▼M4

5. Badanie toksyczności przewlekłej dostarcza informacji na temat potencjalnych zagrożeń dla zdrowia, których pojawienie się jest prawdopodobne w przypadku narażenia powtarzającego się przez znaczną część długości życia gatunku wykorzystanego w badaniu. Badanie dostarczy informacji na temat skutków toksycznych badanej substancji chemicznej oraz wskaże organy docelowe i możliwość akumulacji. Badanie może także dostarczyć szacunkowych informacji na temat poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, które to informacje można wykorzystać do ustalenia kryteriów bezpieczeństwa dla narażenia ludzi. Podkreśla się również konieczność uważnych obserwacji klinicznych zwierząt, aby uzyskać możliwie jak najwięcej informacji.

6. Cele badań w ramach niniejszej metody badawczej obejmują:

— określenie toksyczności przewlekłej badanej substancji chemicznej,

— określenie organów docelowych,

— scharakteryzowanie zależności dawka-odpowiedź,

— określenie poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL), lub punktu wyjścia dla ustalenia dawki wyznaczającej (BMD),

— oszacowanie skutków toksyczności przewlekłej przy poziomach narażenia ludzi,

— dostarczenie danych na potrzeby zbadania hipotez dotyczących sposobu działania (6).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

7. Podczas oceny i oszacowania właściwości toksykologicznych badanej substancji chemicznej laboratorium badawcze powinno wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej przed rozpoczęciem badania, aby opracować taki projekt badania, który umożliwi zbadanie potencjału wywoływania toksyczności przewlekłej w sposób bardziej efektywny oraz zminimalizuje wykorzystanie zwierząt. Informacje, które będą pomocne w opracowywaniu projektu badania, obejmują tożsamość, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej; wszelkie informacje na temat sposobu działania; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*; przewidywane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR oraz dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie powiązanych związków; dostępne dane toksykokinetyczne (jeśli dostępne, dane dotyczące kinetyki jednorazowego podania i podania powtarzanego) oraz dane pochodzące z innych badań narażenia powtarzanego. Ocenę toksyczności przewlekłej należy przeprowadzić wyłącznie po uzyskaniu wstępnych informacji na temat toksyczności na podstawie 28-dniowych lub 90-dniowych badań toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem. W kontekście ogólnej oceny potencjalnych niepożądanych skutków dla zdrowia wywoływanych przez daną badaną substancję chemiczną w badaniu toksyczności przewlekłej należy rozważyć podejście oparte na etapach (11) (12) (13) (14).

8. Metody statystyczne najbardziej odpowiednie do analizy wyników, przy uwzględnieniu układu doświadczalnego i celów badania, należy ustalić przed rozpoczęciem badania. Wśród kwestii, jakie należy rozważyć, znajduje się pytanie, czy dane statystyczne powinny obejmować korektę uwzględniającą zwierzęta, które przeżyły, oraz analizę w przypadku przedwczesnego uśmiercenia jednej grupy lub większej liczby grup. Wytyczne dotyczące odpowiednich analiz statystycznych i kluczowe odniesienia do przyjętych na poziomie międzynarodowym metod statystycznych zawarto w wytycznych nr 116 (6), a także wytycznych nr 35 dotyczących analizy i ewaluacji badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (15).

▼M4

9. Podczas przeprowadzania badania toksyczności przewlekłej należy w każdym przypadku kierować się zasadami przewodnimi i czynnikami przedstawionymi w wytycznych OECD nr 19 dotyczących rozpoznawania, oceny i wykorzystania objawów klinicznych jako humanitarnego punktu końcowego w odniesieniu do zwierząt wykorzystywanych w badaniu oceny bezpieczeństwa (16), a zwłaszcza pkt 62 tego dokumentu. Punkt ten stanowi, że: „*[w] badaniach z zastosowaniem powtarzanej dawki, jeśli zwierzę wykazuje objawy kliniczne, które postępują, prowadząc do dalszego pogorszenia jego stanu, należy podjąć uzasadnioną decyzję, czy w sposób humanitarny uśmiercić takie zwierzę. Taka decyzja powinna opierać się na rozważeniu wartości informacji, jakie można uzyskać dzięki dalszemu utrzymywaniu takiego zwierzęcia w ramach badania, i uwzględniać ogólny stan takiego zwierzęcia. Jeśli zapadnie decyzja o pozostawieniu takiego zwierzęcia w badaniu, częstotliwość obserwacji należy w razie potrzeby zwiększyć. Można także tymczasowo zaprzestać dawkowania, jeśli nie wpłynie to w sposób niekorzystny na cel badania, a zmniejszy cierpienie lub stres odczuwany przez zwierzę, lub też można zmniejszyć podawaną dawkę*”.

10. Szczegółowe wytyczne dotyczące zasad doboru dawek w przypadku badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości, a także omówienie takich zasad, można znaleźć w wytycznych nr 116 (6) oraz w publikacjach Międzynarodowego Instytutu Nauk Biologicznych (ILSI) (17) (18). Główna strategia doboru dawek zależy od głównego celu lub celów badania (pkt 6). Podczas doboru odpowiednich poziomów dawek należy zachować równowagę między kontrolą zagrożenia a określeniem reakcji na niskie dawki i ich istotnością. Ma to szczególne znaczenie w sytuacji, w której planuje się przeprowadzić łączone badanie toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (rozdział B.33 niniejszego załącznika) (pkt 11).

11. Należy rozważyć przeprowadzenie łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (rozdział B.33 niniejszego załącznika) zamiast przeprowadzania osobno badania toksyczności przewlekłej (niniejsza metoda badawcza B.30) i badania rakotwórczości (rozdział B.32 niniejszego załącznika). W porównaniu z przeprowadzaniem dwóch osobnych badań łączone badanie zapewnia większą efektywność pod względem czasu i kosztów, a jednocześnie nie obniża jakości danych na etapie badania toksyczności przewlekłej ani na etapie badania rakotwórczości. Przy przeprowadzaniu łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (rozdział B.33 niniejszego załącznika) należy jednak zwrócić szczególną uwagę na zasady doboru dawek (pkt 9 i 20–25). Uznaje się także, że w przypadku pewnych ram regulacyjnych wymagane może być przeprowadzenie takich badań osobno.

12. Definicje stosowane w kontekście niniejszej metody badawczej można znaleźć na końcu tego rozdziału oraz w wytycznych nr 116 (6).

ZASADA BADANIA

13. Badaną substancję chemiczną podaje się codziennie w dawkach stopniowanych kilku grupom zwierząt doświadczalnych zazwyczaj przez okres 12 miesięcy, choć w zależności od wymogów regulacyjnych można wybrać także dłuższy lub krótszy czas trwania tego etapu badania (zob. pkt 33). Wybiera się wystarczająco długi czas trwania badania, aby umożliwić widoczne pojawienie się wszelkich skutków toksyczności kumulatywnej, jednocześnie unikając mogących wprowadzić w błąd skutków zmian wynikających z wieku. Odstępstwa od 12-miesięcznego czasu trwania narażenia należy uzasadnić, zwłaszcza w przypadku krótszych okresów. Badaną substancję chemiczną podaje się zazwyczaj drogą pokarmową, choć w niektórych przypadkach właściwe może być badanie z zastosowaniem drogi inhalacyjnej lub dermalnej. Projekt badania może obejmować także uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia, np. po upływie 3 i 6 miesięcy, oraz włączenie do badania dodatkowych grup zwierząt w celu umożliwienia takiego działania (zob. pkt 19). Podczas okresu podawania danej substancji zwierzęta obserwuje się uważnie w celu wykrycia objawów toksyczności Zwierzęta, które padną lub zostaną uśmiercone podczas badania, są poddawane sekcji zwłok, a zwierzęta, które przeżyją, są po zakończeniu badania uśmiercane i poddawane sekcji zwłok.

▼M4

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

14. Niniejsza metoda badawcza obejmuje przede wszystkim ocenę i oszacowanie toksyczności przewlekłej u gryzoni (zob. pkt 2), chociaż uznaje się, że w ramach pewnych systemów regulacji wymagane mogą być podobne badania na gatunkach innych niż gryzonie. Wybór gatunku należy uzasadnić. Projekt badania i przeprowadzenie badań toksyczności przewlekłej z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie, jeśli jest to wymagane, powinny opierać się na zasadach określonych w niniejszej metodzie badawczej, a także na zasadach określonych w rozdziale B.27 niniejszego załącznika, dotyczącym 90-dniowego badania toksyczności pokarmowej wywołanej powtarzanym dawkowaniem z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie (5). Dodatkowe informacje na temat wyboru gatunku i szczepu przedstawiono w wytycznych nr 116 (6).

15. Preferowanym gatunkiem gryzoni w ramach niniejszej metody badawczej jest szczur, można jednak wykorzystać także inne gatunki, np. mysz. Szczury i myszy są jak dotąd preferowanymi zwierzętami doświadczalnymi z uwagi na ich względnie krótką długość życia, powszechne wykorzystywanie w badaniach farmakologicznych i toksykologicznych, podatność na powstawanie guzów, a także dostępność dostatecznie scharakteryzowanych szczepów. Z racji tych cech dostępne są znaczne ilości informacji na temat ich fizjologii i patologii. Zaleca się wykorzystanie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt pochodzących ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach. Badanie toksyczności przewlekłej należy przeprowadzić z wykorzystaniem zwierząt z tego samego szczepu i źródła, z którego pochodziły zwierzęta wykorzystane we wstępnych badaniach toksyczności o krótszym czasie trwania. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży.

Warunki przetrzymywania i karmienia

16. Zwierzęta można przetrzymywać pojedynczo lub też w klatkach w małych grupach składających się z osobników tej samej płci; przetrzymywanie zwierząt pojedynczo należy rozważyć, wyłącznie jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia (19) (20) (21). Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Temperatura w pomieszczeniach dla zwierząt doświadczalnych powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, by poza czasem czyszczenia pomieszczenia nie przekraczała 70 %, należy dążyć do utrzymania jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Pasza powinna zaspokajać wszystkie potrzeby żywieniowe badanych gatunków, a obecna w niej zawartość pokarmowych substancji zanieczyszczających, w tym między innymi pozostałości pestycydów, trwałych zanieczyszczeń organicznych, fitoestrogenów, metali ciężkich i mikotoksyn, które mogą wpłynąć na wynik badania, powinna być możliwie jak najniższa. Okresowo należy generować informacje analityczne na temat poziomów substancji zanieczyszczających w składnikach odżywczych i pokarmowych, a przynajmniej na początku badania oraz w przypadku zmiany stosowanej partii. Takie informacje należy uwzględnić w sprawozdaniu końcowym. Informacje analityczne na temat wody pitnej stosowanej w badaniu należy przedstawić w podobny sposób. Na wybór pokarmu może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej mieszaniny badanej substancji chemicznej, a także potrzeba zaspokojenia potrzeb żywieniowych zwierząt, jeśli badaną substancję chemiczną podaje się drogą pokarmową.

Przygotowanie zwierząt

17. Należy wykorzystać zdrowe zwierzęta aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez co najmniej 7 dni oraz niepoddawane wcześniej procedurom doświadczalnym. W przypadku gryzoni dawkowanie substancji należy rozpocząć możliwie jak najszybciej po odsadzeniu i aklimatyzacji oraz najlepiej zanim zwierzęta osiągną wiek 8 tygodni. Badane zwierzęta należy scharakteryzować z uwzględnieniem ich gatunku, szczepu, źródła, płci, masy i wieku. W chwili rozpoczęcia badania odchylenia masy dla obu płci wykorzystanych zwierząt powinny być minimalne i nie może przekraczać ± 20 % średniej masy wszystkich zwierząt wykorzystanych w ramach badania, osobno dla każdej płci. Należy losowo przydzielić zwierzęta do

▼M4

grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu substancji badanej. Po randomizacji między grupami nie powinno być znaczących różnic w średniej wadze osobników w obrębie każdej płci. Jeśli odnotowano statystycznie istotne różnice, randomizację należy powtórzyć, jeśli jest to możliwe. Każdemu zwierzęciu należy przydzielić niepowtarzalny numer identyfikacyjny i w sposób stały oznaczyć je tym numerem poprzez jego wytatuowanie, wszczepienie implantu z chipem lub za pomocą innej odpowiedniej metody.

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

18. Należy wykorzystać zwierzęta obu płci. Należy wykorzystać wystarczającą liczbę zwierząt, tak aby na koniec badania w każdej grupie dostępnych było dostatecznie dużo zwierząt na potrzeby szczegółowych szacunków z punktu widzenia biologicznego i statystycznego. W przypadku gryzoni zazwyczaj należy w odniesieniu do każdego poziomu dawkowania wykorzystać co najmniej 20 zwierząt każdej płci i z każdej grupy, natomiast w przypadku gatunków innych niż gryzonie zaleca się wykorzystanie co najmniej 4 zwierząt każdej płci i z każdej grupy. W celu przeprowadzenia wszystkich wymaganych oznaczeń hematologicznych w przypadku badań z wykorzystaniem myszy może zaistnieć konieczność dodania zwierząt do każdej z grup otrzymujących dawki.

Założenia dotyczące uśmiercania w trakcie trwania doświadczenia, grup satelitarnych i zwierząt wskaźnikowych

19. W ramach badania można założyć uśmiercanie zwierząt w trakcie trwania doświadczenia (co najmniej 10 zwierząt każdej płci i z każdej grupy), np. po upływie 6 miesięcy, w celu uzyskania informacji na temat progresji zmian toksykologicznych oraz informacji dotyczących mechanizmu działania, jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia. Jeśli takie informacje są już dostępne dzięki poprzednim badaniom toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem badanej substancji chemicznej, uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia może nie być uzasadnione z naukowego punktu widzenia. W celu monitorowania odwracalności zmian toksykologicznych wywołanych badaną substancją chemiczną można uwzględnić także grupy satelitarne. Wprowadzenie takich grup zazwyczaj będzie ograniczone do najwyższego poziomu dawki stosowanego w badaniu oraz grupy kontrolnej. W celu monitorowania w trakcie badania statusu choroby można w razie konieczności uwzględnić dodatkową grupę zwierząt wskaźnikowych (zazwyczaj 5 zwierząt każdej płci) (22). Jeśli planuje się uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia lub włączenie grup satelitarnych lub wskaźnikowych, liczbę zwierząt przewidzianą w projekcie badania należy zwiększyć o liczbę zwierząt przeznaczonych do uśmiercenia przed zakończeniem badania. Zwierzęta te zazwyczaj poddaje się takim samym obserwacjom, w tym obserwacjom dotyczącym masy ciała, spożycia pokarmu/wody, pomiarom hematologicznym i pod kątem biochemii klinicznej oraz pod kątem patologii, co zwierzęta wykorzystane w ramach głównego badania na etapie badania toksyczności przewlekłej, choć można założyć (w przypadku grup przewidzianych do uśmiercenia w trakcie trwania doświadczenia) ograniczenie takich pomiarów do konkretnych kluczowych wskaźników, takich jak badanie neurotoksyczności lub immunotoksyczności.

Grupy otrzymujące dawki oraz dawkowanie

20. Wytyczne dotyczące wszystkich aspektów doboru dawek oraz zróżnicowania poziomu dawek zawarto w wytycznych nr 116 (6). Należy zastosować co najmniej trzy poziomy dawek oraz ustanowić równoległą grupę kontrolną, poza przypadkiem, gdy prowadzone jest badanie graniczne (zob. pkt 27). Poziomy dawek będą zazwyczaj oparte na wynikach krótkoterminowych badań z powtarzanym dawkowaniem lub badań ustalających zakres dawkowania oraz należy uwzględnić w tym kontekście wszelkie istniejące dane toksykologiczne i toksykokinetyczne dostępne w odniesieniu do badanej substancji chemicznej lub substancji powiązanych.

▼M4

21. O ile nie ogranicza tego fizykochemiczny charakter lub skutki biologiczne badanej substancji chemicznej, należy zwykle wybrać najwyższy poziom dawki w celu określenia głównych organów docelowych oraz skutków toksycznych, jednocześnie unikając cierpienia, toksyczności ostrej, chorobowości lub śmierci. Uwzględniając czynniki przedstawione w pkt 22 poniżej, należy wybrać najwyższy poziom dawki w celu uzyskania dowodów na toksyczność, potwierdzonych na przykład wolniejszym przybieraniem na wadze (o około 10 %).

22. W zależności od celów badania (zob. pkt 6) można wybrać najwyższą dawkę niższą od dawki potwierdzającej toksyczność, np. jeśli dawka powoduje szkodliwe zmiany istotne dla badania, które mają jednak niewielki wpływ na długość życia czy masę ciała. Górna dawka nie powinna przekroczyć 1 000 mg/kg masy ciała dziennie (dawka graniczna, zob. pkt 27).

23. Poziomy dawek i zróżnicowanie ich poziomów można dobrać tak, by określić odpowiedź zależną od dawki oraz NOAEL lub inny pożądany wynik badania, np. BMD (zob. pkt 25) przy najniższym poziomie dawki. Przy stosowaniu niższych dawek należy rozważyć takie czynniki, jak: spodziewane nachylenie krzywej dawka-efekt, dawki, przy których mogą pojawić się istotne zmiany w metabolizmie, lub charakter działania toksycznego, przy którym oczekuje się wartości granicznej lub punktu wyjścia dla ekstrapolacji dla niskiej dawki.

24. Wybrane zróżnicowanie poziomów dawki będzie zależeć od właściwości badanej substancji chemicznej i nie może zostać z góry określone w niniejszej metodzie badawczej, jednak zastosowanie od podwójnych do poczwórnych odstępów pomiędzy kolejnym dawkowaniem często zapewnia dobre wyniki badania dla ustalenia malejących poziomów dawki, a dodanie czwartej grupy badanej jest często rozwiązaniem preferowanym w porównaniu ze stosowaniem bardzo dużych odstępów pomiędzy kolejnym dawkowaniem (np. pomnożonych przez współczynnik większy niż 6–10). Zasadniczo należy unikać stosowania współczynników większych niż 10, a w przypadku ich zastosowania należy je uzasadnić.

25. Jak opisano pokrótce w wytycznych OECD nr 116 (6), kwestie, jakie należy rozważyć przy doborze dawki, obejmują:

— znane lub podejrzewane nieliniowości lub punkty przegięcia krzywej dawka-efekt,

— toksykokinetykę oraz zakresy dawkowania, przy których występuje lub nie występuje indukcja metaboliczna, nasycenie lub też nieliniowość między dawką zewnętrzną a dawką wewnętrzną,

— prekursorowe zmiany patologiczne, markery skutku lub wskaźniki działania kluczowych podstawowych procesów biologicznych,

— kluczowe (lub podejrzewane) aspekty sposobu działania, takie jak dawki, przy których zaczyna pojawiać się cytotoksyczność, zakłócone zostają poziomy hormonów, przestają działać mechanizmy homeostatyczne itp.,

— regiony krzywej dawka-efekt, gdzie konieczne są szczególnie solidne szacunki, np. w zakresie spodziewanej BMD lub podejrzewanej wartości granicznej,

— uwzględnienie spodziewanych poziomów narażenia ludzi.

▼M4

26. Grupa kontrolna powinna być grupą niepoddawaną działaniu substancji badanej lub grupą kontrolną nośnika, jeśli do podawania badanej substancji chemicznej zastosowano nośnik. Z wyjątkiem poddawania działaniu badanej substancji chemicznej zwierzęta z grupy kontrolnej należy traktować w taki sam sposób jak zwierzęta z grup badanych. Jeśli zastosowano nośnik, grupa kontrolna otrzymuje nośnik w najwyższej objętości stosowanej wśród grup otrzymujących dawki. Jeśli badaną substancję chemiczną podaje się wraz z pokarmem i jeśli powoduje ona znacznie zmniejszone spożycie pokarmu z powodu jego obniżonych walorów smakowych, pomocna może być dodatkowa grupa kontrolna zwierząt otrzymujących pokarm w ilości spożywanej przez zwierzęta z grupy badanej (pair-fed), która zapewni odpowiedniejszą kontrolę.

27. Pełne badanie z zastosowaniem trzech poziomów dawek może zostać uznane za zbędne, jeśli na podstawie informacji pochodzących z badań wstępnych możliwe jest założenie, że badanie z zastosowaniem jednego poziomu dawki, równego co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała dziennie, przeprowadzone z zastosowaniem procedur opisanych w odniesieniu do tego badania, nie spowoduje szkodliwych zmian, oraz jeśli na podstawie danych dotyczących innych strukturalnie powiązanych związków nie przewiduje się toksyczności. Można zastosować limit 1 000 mg/kg masy ciała dziennie, z wyjątkiem sytuacji, gdy narażenie ludzi wskazuje potrzebę zastosowania wyższego poziomu dawki.

Przygotowanie dawek i podanie badanej substancji chemicznej

28. Badaną substancję chemiczną zazwyczaj podaje się drogą pokarmową, wraz z pokarmem lub wodą pitną, lub też za pomocą sondy. Dodatkowe informacje na temat dróg i metod podania przedstawiono w wytycznych nr 116 (6). Droga i metoda podania zależą od celu badania, fizykochemicznych właściwości badanej substancji chemicznej, jej biodostępności oraz głównej drogi i metody narażenia ludzi. Należy przedstawić uzasadnienie wybranej drogi i metody podania. W trosce o dobrostan zwierząt karmienie za pomocą sondy należy wybierać wyłącznie w przypadku tych substancji, dla których taka droga i metoda podania w sposób uzasadniony odzwierciedlają potencjalne narażenie ludzi (np. produktów farmaceutycznych). Substancje występujące w pokarmie lub środowisku naturalnym, w tym pestycydy, podaje się zazwyczaj wraz z pokarmem lub wodą pitną. W przypadku jednak niektórych scenariuszy, np. narażenia zawodowego, podawanie substancji za pomocą innych dróg może być bardziej właściwe.

29. W razie potrzeby badaną substancję chemiczną rozpuszcza się lub sporządza się jej zawiesinę w odpowiednim nośniku. W stosownych przypadkach należy wziąć pod uwagę następujące cechy nośnika i innych dodatków: wpływ na wchłanianie, dystrybucję, metabolizm oraz zatrzymywanie badanej substancji chemicznej; wpływ na chemiczne własności badanej substancji chemicznej, które mogą zmieniać jej charakterystykę toksyczną; oraz wpływ na spożycie pokarmu lub wody lub też na stan odżywienia zwierząt. Zaleca się, w miarę możliwości, najpierw rozważyć zastosowanie wodnego roztworu/zawiesiny, następnie roztworu/emulsji woda-olej (np. z zastosowaniem oleju kukurydzianego), a potem możliwego roztworu w innych nośnikach. W przypadku nośników innych niż woda charakterystyka toksyczna nośnika powinna być znana. Dostępne powinny być także informacje na temat stabilności badanej substancji chemicznej oraz jednorodności roztworów dawek lub pokarmu z dawkami (w stosownych przypadkach) w warunkach podawania (np. pokarmu).

30. W przypadku substancji podawanych w pokarmie lub wodzie pitnej ważne jest dopilnowanie, by takie ilości badanej substancji chemicznej nie zakłócały normalnego odżywiania ani bilansu wodnego organizmu. W przypadku długoterminowych badań toksyczności z zastosowaniem podawania dawek wraz z pokarmem stężenie badanej substancji chemicznej w paszy nie powinno w normalnych warunkach przekraczać górnej granicy 5 % całego pokarmu, aby uniknąć nierównowagi żywieniowej. Przy podawaniu badanej substancji chemicznej wraz z pokarmem można zastosować stałe stężenie w pokarmie (mg/kg pokarmu lub ppm) lub też stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia (mg/kg masy ciała), obliczany cotygodniowo. Należy określić, które rozwiązanie zastosowano.

▼M4

31. Przy podawaniu substancji drogą pokarmową zwierzętom podaje się dawki badanej substancji chemicznej codziennie (siedem dni w tygodniu), zazwyczaj przez okres 12 miesięcy (zob. także pkt 33), chociaż w zależności od wymogów regulacyjnych konieczny może być dłuższy okres podawania danej substancji. Zastosowanie innego schematu dawkowania, np. przez pięć dni w tygodniu, należy uzasadnić. Przy podawaniu substancji drogą dermalną zwierzęta zazwyczaj poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej przez co najmniej 6 godzin dziennie, 7 dni w tygodniu, zgodnie z rozdziałem B.9 niniejszego załącznika (10), przez okres 12 miesięcy. Narażenie drogą inhalacyjną stosuje się przez 6 godzin dziennie, 7 dni w tygodniu, ale możliwe jest zastosowanie narażenia także przez 5 dni w tygodniu, jeśli zostanie to uzasadnione. Okres narażenia zazwyczaj wynosi 12 miesięcy. Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu wyłącznie poprzez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować tak, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. W przypadku stosowania okresu narażenia krótszego niż 6 godzin dziennie należy przedstawić stosowne uzasadnienie. Zobacz również rozdział B.8 niniejszego załącznika (8).

32. Jeśli badaną substancję chemiczną podaje się zwierzętom za pomocą sondy, należy dokonywać tego z użyciem sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej każdego dnia o podobnych porach. Zazwyczaj podaje się pojedynczą dawkę raz dziennie, jeśli jednak substancja jest na przykład substancją wykazującą miejscowe działanie drażniące, możliwe jest zachowanie dziennej mocy dawki poprzez podawanie jej jako dawki dzielonej (dwa razy dziennie). Maksymalna objętość cieczy, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość taka powinna być możliwie jak najniższa i nie powinna w normalnych warunkach przekraczać 1 ml/100 g masy ciała w przypadku gryzoni (22). Zmienność stosowanej objętości należy zminimalizować poprzez dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość przy wszystkich poziomach dawek. Wyjątkiem są substancję potencjalnie żrące lub wykazujące działanie drażniące, które należy rozcieńczyć w celu uniknięcia miejscowych ostrych skutków. Należy unikać badania z użyciem stężeń, które mogą mieć działanie żrące lub drażniące na przewód pokarmowy.

Czas trwania badania

33. Mimo że niniejsza metoda badawcza jest przede wszystkim zaprojektowana jako 12-miesięczne badanie toksyczności przewlekłej, w ramach projektu badania można zaplanować i zastosować krótszy (wynoszący np. 6 lub 9 miesięcy) lub dłuższy (wynoszący np. 18 miesięcy lub 24 miesiące) czas trwania badania w zależności od wymogów poszczególnych systemów regulacyjnych lub w przypadku specyficznych celów modeli mechanistycznych. Odstępstwa od 12-miesięcznego czasu trwania narażenia należy uzasadnić, zwłaszcza w przypadku krótszych okresów. Grupy satelitarne wprowadzone w celu monitorowania odwracalności zmian toksykologicznych wywołanych przez badaną substancję chemiczną należy utrzymać bez podawania danej substancji przez okres nie krótszy niż 4 tygodnie oraz nie dłuższy niż jedna trzecia całego okresu trwania badania po ustaniu narażenia. Dalsze wytyczne, w tym dotyczące sposobu uwzględnienia zwierząt, które przeżyły badanie, przedstawiono w wytycznych nr 116 (6).

OBSERWACJE

34. Wszystkie zwierzęta należy sprawdzić pod kątem chorobowości i upadkowości, zazwyczaj na początku i pod koniec każdego dnia, włącznie z weekendami i dniami wolnymi od pracy. Ogólnych obserwacji klinicznych należy dokonywać co najmniej raz dziennie, najlepiej o tej samej porze lub porach każdego dnia, uwzględniając szczytowy okres przewidywanych skutków po podaniu dawki w przypadku podawania substancji badanej za pomocą sondy.

▼M4

35. Przynajmniej raz przed pierwszym narażeniem należy dokonać szczegółowej obserwacji klinicznej wszystkich zwierząt (w celu umożliwienia porównań dotyczących tych samych osobników), a także pod koniec pierwszego tygodnia badania, a po tym okresie – co miesiąc. Protokół dotyczący obserwacji należy opracować tak, by zminimalizować odchylenia między poszczególnymi obserwatorami i by były one niezależne od badanej grupy. Obserwacji należy dokonywać poza klatką zwierzęcia, najlepiej w warunkach standardowych i za każdym razem o podobnych porach. Obserwacje należy starannie odnotować, najlepiej za pomocą systemów punktacji wyraźnie określonych przez laboratorium badawcze. Należy dołożyć starań w celu dopilnowania, aby odchylenia w warunkach obserwacji były minimalne. Odnotowane objawy powinny obejmować między innymi zmiany na skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin i wydalin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego (np. łzawienie, piloerekcję, rozmiar źrenicy, nietypowy rytm oddychania). Należy odnotować także zmiany w sposobie chodzenia, postawie i reakcji na dotyk, jak również obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, zachowań stereotypowych (np. nadmierne czyszczenie się, powtarzające się krążenie w kółko) oraz dziwne zachowania (np. samookaleczanie się, chodzenie do tyłu) (24).

36. Badanie oftalmologiczne, za pomocą oftalmoskopu lub innego odpowiedniego sprzętu, należy przeprowadzić u wszystkich zwierząt przed pierwszym podaniem badanej substancji chemicznej. Badanie to należy przeprowadzić także wraz z zakończeniem badania, najlepiej u wszystkich zwierząt, a co najmniej w grupach otrzymujących wysokie dawki i w grupach kontrolnych. W przypadku wykrycia w oczach zmian związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej należy przebadać wszystkie zwierzęta. Jeśli wyniki analizy strukturalnej lub inne informacje wskazują na toksyczność dla oczu, należy zwiększyć częstotliwość badania oczu.

37. W przypadku substancji chemicznych, dla których poprzednie 28-dniowe lub 90-dniowe badania toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem wykazały prawdopodobieństwo wywoływania działania neurotoksycznego, przed rozpoczęciem badania oraz co 3 miesiące po rozpoczęciu badania przez okres do 12 miesięcy, a także na zakończenie badania (jeśli jego czas trwania jest dłuższy niż 12 miesięcy) można przeprowadzić ocenę reaktywności na różnego typu bodźce (24) (np. bodźce słuchowe, wizualne i proprioceptywne) (25) (26) (27), siły uchwytu (28) oraz ocenę aktywności motorycznej (29). Dalsze szczegółowe informacje na temat procedur, jakie można zastosować, podano w odpowiednich źródłach. Można jednak zastosować również procedury inne niż te podane w bibliografii.

38. W przypadku substancji chemicznych, dla których poprzednie 28-dniowe lub 90-dniowe badania toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem wykazały prawdopodobieństwo wywoływania działania immunotoksycznego, dalsze badania tego punktu końcowego można przeprowadzić wraz z zakończeniem badania.

Masa ciała, spożycie pokarmu/wody i wydajność pokarmu

39. Wszystkie zwierzęta należy zważyć na początku rozpoczęcia poddawania ich działaniu substancji badanej, a także co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Pomiarów spożycia pokarmu i wydajności pokarmu należy dokonywać co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Spożycie wody należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu, jeśli substancję badaną podaje się w wodzie pitnej. Pomiary spożycia wody należy rozważyć także w przypadku badań, w których zachodzą zmiany związane ze spożyciem wody.

▼M4

Hematologia i biochemia kliniczna

40. W przypadku badań z wykorzystaniem gryzoni badania hematologiczne należy przeprowadzać u co najmniej 10 samców i 10 samic w każdej grupie po upływie 3, 6 i 12 miesięcy, a także wraz z zakończeniem badania (jeśli jego czas trwania jest dłuższy niż 12 miesięcy), wykorzystując w tym celu te same osobniki przez cały okres badania. W przypadku wykorzystania w badaniu myszy konieczne może być wprowadzenie zwierząt satelitarnych w celu przeprowadzenia wszystkich wymaganych oznaczeń hematologicznych (zob. pkt 18). W badaniach z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie próbki należy pobierać od mniejszej liczby zwierząt (np. od 4 zwierząt dla każdej płci i grupy w badaniach z wykorzystaniem psów) w trakcie badania oraz wraz z jego zakończeniem, tak jak opisano w odniesieniu do badań z wykorzystaniem gryzoni. Nie ma konieczności przeprowadzania pomiarów po upływie 3 miesięcy – zarówno w przypadku gryzoni, jak i gatunków innych niż gryzonie – jeśli w poprzednim 90-dniowym badaniu przeprowadzonym przy porównywalnych poziomach dawek nie odnotowano zmian parametrów hematologicznych. Próbki krwi należy pobrać z określonego miejsca, na przykład poprzez nakłucie serca lub z zatoki oczodołowej tylnej, w znieczuleniu.

41. Należy zbadać następujące parametry (30): całkowitą i różnicową liczbę leukocytów, liczbę czerwonych krwinek, liczbę płytek krwi, stężenie hemoglobiny, hematokryt (HCT), średnią objętość krwinki czerwonej (MCV), średnią masę hemoglobiny w krwince czerwonej (MCH), średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej (MCHC), czas protrombinowy oraz czas częściowej tromboplastyny po aktywacji. W stosownych przypadkach można zmierzyć inne parametry hematologiczne, takie jak ciałka Heinza lub inne nietypowe parametry morfologii erytrocytów lub methemoglobiny, w zależności od toksyczności badanej substancji chemicznej. Zasadniczo należy przyjąć elastyczne podejście, dostosowane do obserwowanych lub spodziewanych skutków danej badanej substancji chemicznej. Jeśli badana substancja chemiczna ma wpływ na układ krwiotwórczy, można również przeprowadzić badanie liczby retikulocytów i cytologię szpiku kostnego, choć nie trzeba przeprowadzać takich badań rutynowo.

42. Oznaczenia parametrów biochemii klinicznej w celu zbadania głównych skutków toksycznych w tkankach, a w szczególności skutków dla nerek i wątroby, należy wykonać na próbkach krwi pobranych od co najmniej 10 samców i 10 samic z każdej grupy w takich samych odstępach czasowych jak w przypadku badań hematologicznych, wykorzystując w tym celu te same osobniki przez cały okres badania. W przypadku wykorzystania w badaniu myszy konieczne może być wprowadzenie zwierząt satelitarnych w celu przeprowadzenia wszystkich wymaganych oznaczeń parametrów biochemii klinicznej. W badaniach z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie próbki należy pobierać od mniejszej liczby zwierząt (np. od 4 zwierząt dla każdej płci i grupy w badaniach z wykorzystaniem psów) w trakcie badania oraz wraz z jego zakończeniem, tak jak opisano w odniesieniu do badań z wykorzystaniem gryzoni. Nie ma konieczności przeprowadzania pomiarów po upływie 3 miesięcy, zarówno w przypadku gryzoni, jak i gatunków innych niż gryzonie, jeśli w poprzednim 90-dniowym badaniu przeprowadzonym przy porównywalnych poziomach dawek nie odnotowano zmian parametrów biochemii klinicznej. Zalecane jest wstrzymanie podawania zwierzętom pokarmu (z wyjątkiem myszy) przez noc poprzedzającą pobranie krwi. Należy zbadać następujące parametry (30): glukoza, mocznik (azot mocznikowy), kreatynina, białko całkowite, albumina, wapń, sód, potas, cholesterol całkowity, co najmniej dwa odpowiednie badania w celu oceny komórek wątroby (aminotransferaza alaninowa, aminotransferaza asparaginianowa, dehydrogenaza glutaminianowa, kwasy żółciowe całkowite) (31), oraz co najmniej dwa odpowiednie badania w celu oceny wątroby i dróg żółciowych (fosfataza alkaliczna, gamma-glutamylotranspeptydaza, 5'-nukleotydaza, bilirubina całkowita, kwasy żółciowe całkowite) (31). W stosownych przypadkach można zbadać inne parametry biochemii klinicznej, takie jak: stężenie trójglicerydów na czczo, poziom określonych hormonów oraz poziom pseudocholinesterazy, w zależności od toksyczności badanej substancji chemicznej. Ogólnie rzecz biorąc, należy przyjąć elastyczne podejście w zależności od gatunku oraz obserwowanych lub spodziewanych skutków danej badanej substancji chemicznej.

▼M4

43. Oznaczenia w ramach analizy moczu należy przeprowadzić u co najmniej 10 samców i 10 samic z każdej grupy na próbkach pobranych w takich samych odstępach czasu jak w przypadku hematologii i biochemii klinicznej. Nie ma konieczności przeprowadzania pomiarów po upływie 3 miesięcy, jeśli w poprzednim 90-dniowym badaniu przeprowadzonym przy porównywalnych poziomach dawek nie odnotowano zmian w analizie moczu. Zalecenie ekspertów dotyczące badań klinicznych pod kątem patologii obejmuje następujące parametry (30): wygląd, objętość, osmolalność lub ciężar właściwy, pH, białko całkowite i glukoza. Inne oznaczenia obejmują ketony, urobilinogen, bilirubinę i krew utajoną. W stosownych przypadkach można zastosować badania dodatkowych parametrów w celu rozszerzenia badania zaobserwowanych skutków.

44. Ogólnie uznaje się, że podstawowe zmienne hematologiczne i biochemii klinicznej należy zbadać przed poddaniem zwierząt działaniu substancji badanej w przypadku badań z wykorzystaniem psów, jednak nie ma takiej potrzeby w przypadku badań z wykorzystaniem gryzoni (30). Jeśli jednak historyczne dane podstawowe (zob. pkt 50) są nieodpowiednie, należy rozważyć wygenerowanie takich danych.

Patologia

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

45. Wszystkie zwierzęta wykorzystane w badaniu należy zazwyczaj poddać pełnemu, szczegółowemu rozpoznaniu histopatologicznemu, które obejmuje staranne zbadanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszystkich otworów, jamy czaszki, jamy klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Można jednak założyć (w grupach przewidzianych do uśmiercenia w trakcie trwania doświadczenia lub w grupach satelitarnych) ograniczenie pomiarów do poszczególnych kluczowych wskaźników, takich jak badanie neurotoksyczności lub immunotoksyczności (zob. pkt 19). Takie zwierzęta nie muszą zostać poddane sekcji zwłok ani dalszym procedurom opisanym w poniższych punktach. Zwierzęta wskaźnikowe mogą w poszczególnych przypadkach wymagać sekcji zwłok, według uznania kierownika badania.

46. Należy odnotować masy organów wszystkich zwierząt, prócz tych wyłączonych na mocy ostatniej części pkt 45. Nadnercza, mózg, najądrza, serce, nerki, wątrobę, jajniki, śledzionę, jądra, tarczycę (zważoną po utrwaleniu, z przytarczycami) oraz macicę pobrane od wszystkich zwierząt (oprócz tych znalezionych w stanie agonalnym lub uśmierconych w trakcie trwania doświadczenia) należy w stosownych przypadkach okroić z wszelkich przylegających tkanek i zmierzyć ich masę mokrą możliwie jak najszybciej po sekcji w celu zapobiegnięcia ich wyschnięciu. W badaniu z wykorzystaniem myszy ważenie nadnerczy jest opcjonalne.

47. Następujące tkanki należy zachować w roztworze utrwalającym najbardziej odpowiednim zarówno dla rodzaju tkanki, jak i planowanego późniejszego badania histopatologicznego (32) (tkanki podane w nawiasach kwadratowych są opcjonalne):

wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne	serce	trzustka	żołądek (przedżołądek, żołądek gruczołowy)
nadnercze	jelito kręte	przytarczyca	[zęby]
aorta	jelito czcze	nerw obwodowy	jądro
mózg (w tym części kresomózgowia, móżdżku i rdzenia/mostu)	nerka	przysadka	grasica
jelito ślepe	gruczoł łzowy (oczodołowy)	prostata	tarczyca
szyjka macicy	wątroba	odbytnica	[język]

▼M4

gruczoł koagulujący	płuco	gruczoł ślinowy	tchawica
okrężnica	węzły chłonne (powierzchowne i głębokie)	pęcherzyk nasienny	pęcherz moczowy
dwunastnica	gruczoł mlekowy (obowiązkowo w przypadku samic oraz, jeśli wyraźnie nadaje się do analizy, również w przypadku samców)	mięsień szkieletowy	macica (w tym szyjka macicy)
najądrze	[górne drogi oddechowe, w tym nos, małżowiny nosowe oraz zatoki przynosowe]	skóra	[moczowód]
oko (w tym siatkówka)	przełyk	rdzeń kręgowy (na trzech odcinkach: szyjnym, śródpiersiowym i lędźwiowym)	[cewka moczowa]
[kość udowa ze stawem]	[opuszka węchowa]	śledziona	pochwa
pęcherzyk żółciowy (w przypadku gatunków innych niż szczur)	jajnik	[mostek]	wycinek szpiku kostnego lub świeży aspirat szpiku kostnego
gruczoł przyoczny			

W przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy utrwalić oba organy. Wyniki badań klinicznych i innych testów mogą wskazać na konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Organy uznane w oparciu o znane właściwości badanej substancji chemicznej za prawdopodobne organy docelowe także należy zachować. W przypadku badań z zastosowaniem dermalnej drogi podania należy utrwalić organy zgodnie z listą określoną dla podania drogą pokarmową, przy czym kluczowe jest pobranie i zachowanie próbek skóry z miejsca aplikacji. W przypadku badań z zastosowaniem inhalacyjnej drogi podania, układając listę tkanek z dróg oddechowych do zachowania i zbadania, należy kierować się zaleceniami zawartymi w rozdziale B.8 niniejszego załącznika (8) i rozdziale B.29 niniejszego załącznika (9). W przypadku innych organów/tkanek (oraz oprócz określonych utrwalonych tkanek z dróg oddechowych) należy zbadać organy zgodnie z listą określoną dla podania drogą pokarmową.

Histopatologia

48. Dostępne są wytyczne dotyczące najlepszych praktyk związanych z przeprowadzaniem toksykologicznych badań zmian patologicznych (32). Badaniu histopatologicznemu należy poddać co najmniej następujące tkanki:

— wszystkie tkanki zwierząt z grup otrzymujących wysokie dawki i z grup kontrolnych,

— wszystkie tkanki zwierząt padłych lub uśmierconych podczas badania,

— wszystkie tkanki wykazujące makroskopowe nieprawidłowości,

— tkanki docelowe lub tkanki, które wykazują zmiany spowodowane poddaniem zwierzęcia działaniu substancji badanej w grupie otrzymującej wysokie dawki, pobrane od wszystkich zwierząt we wszystkich innych grupach otrzymujących dawki,

— w przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy zbadać oba organy.

▼M4

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

49. W odniesieniu do wszystkich parametrów poddawanych oszacowaniu należy przedstawić dane dotyczące każdego zwierzęcia. Dodatkowo wszystkie dane należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt padłych w trakcie trwania badania lub uśmierconych z przyczyn humanitarnych, wraz z określeniem czasu zgonu lub humanitarnego uśmiercenia, liczbę zwierząt wykazujących objawy toksyczności, opis obserwowanych objawów toksyczności, w tym czas ich pojawienia się, czas trwania, stopień ostrości wszelkich skutków toksycznych, liczbę zwierząt wykazujących zmiany patologiczne, typ takich zmian oraz procent zwierząt wykazujących każdy typ zmiany. W tabelach z zestawieniem danych należy oprócz klasyfikacji zmian patologicznych przedstawić średnie i standardowe odchylenia (dla danych z badań ciągłych) dotyczące zwierząt wykazujących skutki toksyczne lub zmiany patologiczne.

50. Historyczne dane kontrolne mogą być cenne przy interpretacji wyników badania, np. jeśli istnieją przesłanki, że dane uzyskane z równoczesnych kontroli są w sposób znaczący niestandardowe w porównaniu z najnowszymi danymi dotyczącymi zwierząt kontrolnych z tej samej placówki przeprowadzającej badanie/badanej kolonii. Historyczne dane kontrolne, jeśli poddaje się je oszacowaniu, powinno przedstawić to samo laboratorium i powinny się one odnosić do zwierząt w tym samym wieku i z tego samego szczepu. Dane takie powinny zostać wygenerowane w ciągu pięciu lat przed rozpoczęciem rozważanego badania.

51. W stosownych przypadkach wyniki liczbowe należy poddawać oszacowaniu za pomocą właściwych i ogólnie przyjętych metod statystycznych. Metody statystyczne i dane poddawane analizie należy wybrać w czasie przygotowywania projektu badania (pkt 8). Taki wybór powinien obejmować w razie konieczności korektę uwzględniającą zwierzęta, które przeżyły.

Sprawozdanie z badania

52. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— cechy fizyczne, czystość i własności fizykochemiczne,

— dane identyfikacyjne,

— źródło substancji chemicznej,

— numer partii,

— świadectwo analizy chemicznej.

Nośnik (w stosownych przypadkach)

— uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda).

Badane zwierzęta

— wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie takiego wyboru,

— liczba, wiek i płeć zwierząt na początku badania,

▼M4

— źródło, warunki przetrzymywania, pokarm itp.,

— masa ciała poszczególnych zwierząt na początku badania.

Warunki badania

— uzasadnienie drogi podania i doboru dawek,

— w stosownych przypadkach metody statystyczne zastosowane do analizy danych,

— szczegółowe informacje na temat postaci użytkowej badanej substancji chemicznej/przygotowywania pokarmu,

— dane analityczne dotyczące osiąganego stężenia, stabilności i jednorodności preparatu,

— droga podania i szczegółowe dane dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,

— w przypadku badań inhalacyjnych informacje o tym, czy narażenie odbywa się wyłącznie przez nos czy przez całe ciało,

— dawki rzeczywiste (mg/kg masy ciała/dzień) oraz w stosownych przypadkach wskaźnik konwersji stężenia badanej substancji chemicznej w pokarmie/wodzie pitnej (mg/kg lub ppm) do dawki rzeczywistej,

— szczegółowe informacje o pokarmie i jakości wody.

Wyniki (należy przedstawić zestawienie danych w tabeli oraz dane dotyczące poszczególnych zwierząt)

— dane dotyczące zwierząt, które przeżyły,

— masa ciała/zmiany masy ciała,

— dane dotyczące spożycia pokarmu, wyliczenia wydajności pokarmu, jeśli przeprowadzono, oraz w stosownych przypadkach dane dotyczące spożycia wody,

— dane dotyczące efektu toksycznego według płci i poziomu dawki, włączając objawy toksyczności,

— rodzaj, występowanie (i ostrość, jeśli poddano ją ocenie) oraz czas trwania obserwowanych objawów klinicznych (tak odwracalnych, jak i nieodwracalnych),

— wyniki badania oftalmologicznego,

— wyniki badania hematologicznego,

— wyniki klinicznych badań biochemicznych,

— wyniki analizy moczu,

— wynik wszelkich badań neurotoksyczności lub immunotoksyczności,

— masa ciała w chwili zgonu,

— masa organów (i w stosownych przypadkach ich współczynniki),

— wyniki sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników badań histopatologicznych związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej,

— dane dotyczące wchłaniania, jeśli są dostępne.

▼M4

W stosownych przypadkach statystyczne opracowanie wyników

Omówienie wyników, w tym:

— zależność dawka-odpowiedź,

— rozważenie wszelkich informacji na temat sposobu działania,

— omówienie wszelkich podejść modelowych,

— określenie BMD, NOAEL lub LOAEL,

— historyczne dane kontrolne,

— znaczenie dla ludzi.

Wnioski

BIBLIOGRAFIA:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rzym, 1995), wewnętrzny dokument roboczy, Dyrekcja ds. Środowiska, OECD, Paryż.

(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 i in. (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) Rozdział B.27 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności podprzewlekłej drogą pokarmową – badania toksyczności drogą pokarmową na gatunkach innych niż gryzonie metodą powtarzanej 90-dniowej dawki.

(6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – wyd. drugie. Series on Testing and Assessment nr 116, dostępne na publicznej stronie OECD poświęconej wytycznym dotyczącym badań: www.oecd.org/env/testguidelines.

(7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment nr 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paryż.

(8) Rozdział B.8 niniejszego załącznika. Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (inhalacyjna).

(9) Rozdział B.29 niniejszego załącznika. Badanie podprzewlekłej toksyczności inhalacyjnej – 90-dniowe badania inhalacyjne z wykorzystaniem gatunków gryzoni.

(10) Rozdział B.9 niniejszego załącznika, Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (dermalna).

(11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR i in. (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 i in. (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 i in. (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 i in. (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 nr 35 oraz Series on Pesticides nr 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paryż.

(16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, nr 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paryż.

(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 (Międzynarodowy Instytut Nauk Biologicznych) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (red.). ILSI Press, Waszyngton, D.C.

(19) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication nr 86-23. Waszyngton D.C., Departament Zdrowia i Opieki Społecznej Stanów Zjednoczonych.

(21) GV-SOLAS (Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, 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 (Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, 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 nr 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 i in. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198–201.

(31) EMEA, projekt dokumentu pt. „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (nr ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK i in. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICJA

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼B

B.31. **BADANIE PRZEDURODZENIOWEJ TOKSYCZNOŚCI ROZWOJOWEJ**

1. **METODA**

Niniejsza metoda jest kopią OECD TG 414 (2001).

1.1. WPROWADZENIE

Opisana metoda określania toksyczności rozwojowej opracowana została w celu uzyskania ogólnych informacji dotyczących wpływu przedurodzeniowej ekspozycji na badane zwierzę ciężarne oraz na organizm rozwijający się *in utero*; może ona obejmować zarówno skutki dla matki, jak również śmierć, wady w budowie lub nieprawidłowości wzrostu płodu. Badanie niedoborów funkcjonalnych, chociaż są one ważnym elementem rozwoju, nie stanowi integralnej części tej metody. Mogą być badane w oddzielnym badaniu lub też jako dodatek do tego badania, przy wykorzystaniu metody badania neurotoksyczności rozwojowej. W celu uzyskania informacji o badaniu niedoborów funkcjonalnych i innych skutków postnatalnych należy zapoznać się z metodą badania toksyczności reprodukcji oraz badaniem neurotoksyczności rozwojowej jako metodami właściwymi.

W indywidualnych przypadkach niniejsza metoda badania może wymagać konkretnego dostosowania, uwzględniającego konkretną wiedzę, np. o fizykochemicznych lub toksykologicznych własnościach badanej substancji. Dostosowania takie są dopuszczalne, jeżeli przekonujące dowody naukowe świadczą, że doprowadzi ona do badania przynoszącego więcej informacji. W takim przypadku należy w sprawozdaniu z badań dokładnie udokumentować wspomniane dowody naukowe.

1.2. DEFINICJE

Toksykologia rozwojowa: badanie niekorzystnych skutków wywieranych na rozwijający się organizm, które mogą być wynikiem ekspozycji przed zapłodnieniem, podczas rozwoju przedurodzeniowego lub po urodzeniu, do okresu osiągnięcia dojrzałości płciowej. Główne przejawy toksyczności rozwojowej obejmują: 1) śmierć organizmu; 2) nieprawidłowość strukturalną; 3) zmianę we wzroście; i 4) niedobór funkcjonalny. Toksykologia rozwojowa była wcześniej często nazywana teratologią.

Niekorzystny skutek: jakakolwiek mająca związek z poddaniem badaniu zmiana, w stosunku do danych bazowych, która zmniejsza zdolność organizmu do przeżycia, rozmnażania lub przystosowania się do środowiska. W odniesieniu do najszerzej ujętej toksykologii rozwojowej obejmuje on każdy skutek, który stanowi przeszkodę dla normalnego rozwoju jaja płodowego, przed i po urodzeniu.

Zmiana we wzroście: zmiana w narządzie, masie ciała lub wielkości potomka.

Nieprawidłowości (anomalie): strukturalne nieprawidłowości w rozwoju, obejmujące zarówno wady rozwojowe jak i odchylenia (28).

Wada rozwojowa/znaczna nieprawidłowość: zmiana strukturalna uznana za szkodliwą dla zwierzęcia (może być również letalna), która zazwyczaj występuje rzadko.

▼B

Odchylenie/nieznaczna nieprawidłowość: zmiana strukturalna uznana za mało szkodliwą lub nieszkodliwą dla zwierzęcia; może być przejściowa i w populacji kontrolnej może występować względnie często.

Jajo płodowe: całość wytworów zapłodnionego jaja w każdym stadium rozwoju od zapłodnienia do urodzenia, wliczając w to błony pozazarodkowe, jak również sam zarodek lub płód.

Zagnieżdżenie: przyczepienie się blastocysty do nabłonka wyścielającego macicę, obejmujące również przeniknięcie blastocysty poprzez nabłonek macicy i jej zagłębienie się w śluzówce macicy.

Zarodek: wczesne stadium rozwojowe jakiegokolwiek organizmu, szczególnie rozwijający się produkt zapłodnienia jaja, po pojawieniu się długiej osi aż do stanu, w którym widoczne są wszystkie główne struktury.

Embriotoksyczność: szkodliwa dla normalnej budowy, rozwoju, wzrostu i/lub zdolności do życia zarodka.

Płód: nienarodzone potomstwo w okresie postembrionalnym.

Toksyczność dla płodu: szkodliwa dla normalnej budowy, rozwoju, wzrostu i/lub zdolności do życia płodu.

Poronienie: przedwczesne wydalenie z macicy produktów zapłodnienia: zarodka lub płodu niezdolnego do życia.

Resorpcja: jajo płodowe, które po zagnieżdżeniu się w macicy następnie obumarło i zostało lub jest resorbowane.

Wczesna resorpcja: ślad zagnieżdżenia bez widocznego zarodka/płodu.

Późna resorpcja: martwy zarodek lub płód z zewnętrznymi zmianami zwyrodnieniowymi.

NOAEL: poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian oznacza najwyższą dawkę lub poziom ekspozycji przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian.

1.3. SUBSTANCJA ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Substancja testowa podawana jest zwykle ciężarnym samicom co najmniej od zagnieżdżenia do ostatniego dnia przed planowanym uśmierceniem, które powinno przypadać jak najbliżej normalnej daty porodu bez ryzyka utraty danych wynikających z wczesnego porodu. Omawiana metoda nie ma na celu badania jedynie okresu organogenezy (np. dni 5–15 u gryzonia i dni 6–18 u królika), ale również skutki występujące w okresie przedimplantacyjnym, w stosownych przypadkach, przez cały okres ciąży do ostatniego dnia przed cesarskim cięciem. Na krótko przed cesarskim cięciem samice zostają uśmiercone, zawartość macic zbadana, a płody oceniane pod względem widocznych zewnętrznych nieprawidłowości i zmian w tkance miękkiej i kostnej.

▼B

1.5. OPIS METODY BADAŃ

1.5.1. **Wybór gatunków zwierząt**

Zaleca się prowadzenie badań na najbardziej odpowiednim gatunku oraz wykorzystanie gatunków i szczepów laboratoryjnych powszechnie używanych w badaniach toksyczności przeudrodzeniowej. Preferowanym gatunkiem gryzonia jest szczur, a spośród z gatunków innych niż gryzonie – królik. Jeżeli wykorzystuje się inny gatunek należy podać uzasadnienie.

1.5.2. **Warunki przebywania i warunki żywieniowe**

Temperatura w badawczych pomieszczeniach hodowlanych powinna wynosić 22 °C (± 3°) dla gryzoni i 18 °C (± 3°) dla królików. Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin jasno, 12 godzin ciemno. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej.

Procedury krycia przeprowadza się w klatkach nadających się do tego celu. Chociaż pożądane jest trzymanie zwierząt krytych w oddzielnych klatkach, dopuszczalne jest również umieszczanie w klatkach w małych grupach.

1.5.3. **Przygotowania**

Należy wykorzystywać zdrowe zwierzęta aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych co najmniej przez okres pięciu dni przed rozpoczęciem testu, niepoddawane wcześniej procedurom badawczym. Badane zwierzęta należy scharakteryzować ze względu na gatunek, szczep, źródło, płeć, wagę i/lub wiek. Na ile to praktycznie możliwe, zwierzęta we wszystkich grupach badanych powinny być jednakowej masy ciała i wieku. Do każdego poziomu dawek należy wykorzystać młode dojrzałe samice, które nie rodziły. Samice powinny być kryte samcami tego samego gatunku i szczepu, należy również unikać krycia pomiędzy rodzeństwem. U gryzoni dzień 0 danej ciąży jest określany w momencie wykrycia czopu nasienia i/lub spermy w pochwie; u królików dzień 0 określany jest zwykle w dniu kopulacji lub sztucznej inseminacji, jeśli zastosowano tę technikę. Pokryte samice należy przydzielić w sposób losowy do grup kontrolnych i badanych. Klatki powinny być ustawione w taki sposób, żeby zminimalizować możliwy wpływ położenia klatki. Zwierzęta są identyfikowane jednoznacznie. Pokryte samice należy przydzielić w sposób losowy do grup kontrolnych i badanych, zaś jeżeli samice są pokrywane w seriach, zwierzęta z każdej serii należy rozdzielić równomiernie pomiędzy grupy. Podobnie samice zainseminowane przez tego samego samca powinny być rozdzielone równomiernie pomiędzy grupy.

1.6. PROCEDURA

1.6.1. **Liczba i płeć zwierząt**

Każda grupa badana i kontrolna powinna składać się z wystarczającej liczby samic, aby znalazło się w nich około 20 samic z miejscami zagnieżdżenia, w czasie kiedy poddawane są sekcji. Grupy składające się z mniej niż 16 zwierząt z miejscami zagnieżdżenia mogą być niewłaściwe. Zgony matek nie zawsze powodują nieważność badania, pod warunkiem że nie przekraczają ok. 10 %.

▼B

1.6.2. **Przygotowanie dawek**

Jeżeli w celu usprawnienia dawkowania używa się nośnika lub innego dodatku, należy uwzględnić następujące charakterystyki: skutek wywierany na absorpcję, dystrybucję, metabolizm oraz na zatrzymywanie lub ekskrecję substancji testowej; skutki wywierane na chemiczne własności substancji testowej, które mogą zmienić jej charakterystykę toksyczną; należy również uwzględnić wpływ na pobieranie pokarmu lub wody, lub stan odżywienia zwierząt. Nośnik nie powinien wykazywać toksyczności rozwojowej ani wpływać na reprodukcję.

1.6.3. **Dawkowanie**

Zazwyczaj substancja testowa powinna być podawana codziennie od dnia zagnieżdżenia (np. w dniu 5 po kryciu) do dnia przed cięciem cesarskim. Jeżeli badania wstępne, jeśli są dostępne, nie wskazują na dużą możliwość wystąpienia strat przedimplantacyjnych, podawanie można rozciągnąć na cały okres ciąży, od dnia krycia do dnia poprzedzającego planowane uśmiercenie. Jest rzeczą powszechnie znaną, że niewłaściwe postępowanie ze zwierzętami lub stres podczas ciąży może powodować straty przedurodzeniowe. W celu zabezpieczenia się przed stratami przedurodzeniowymi, spowodowanymi przez czynniki niezwiązane z podawaniem dawek, należy unikać niekoniecznego niepokojenia i przenoszenia ciężarnych zwierząt, jak również powodowania stresów przez czynniki zewnętrzne, takie jak np. hałas.

Należy użyć co najmniej trzech grup dawkowania i jednoczesną grupę kontrolną. Zdrowe zwierzęta są losowo przydzielane do grupy kontrolnej i badanej. Poziomy dawkowania powinny być zróżnicowane w celu osiągnięcia stopniowania skutków toksycznych. Jeżeli charakter fizykochemiczny lub własności biologiczne substancji testowanej nie powodują ograniczenia, najwyższą dawkę należy dobrać w taki sposób, aby wywołać pewną toksyczność rozwojową i/lub toksyczność względem matek (objawy kliniczne lub spadek masy ciała, ale nie śmierć lub poważne cierpienie). Co najmniej jedna dawka pośrednia nie powinna dawać żadnych oznak toksyczności względem matek lub toksyczności rozwojowej. Należy zastosować sekwencję coraz mniejszych dawek, aby zademonstrować wszelkie reakcje związane z dawkowaniem i określić poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL). Dwa do czterech interwałów dawkowania jest często optymalne dla ustalenia malejących poziomów dawki i dodanie czwartej grupy badanej jest często bardziej pożądane niż stosowanie bardzo dużych interwałów dawek (np. współczynnik większy od 10) między dawkowaniem. Chociaż celem jest ustalenie NOAEL u matek, badania, które nie ustalają tego poziomą, mogą być również do przyjęcia (1).

Poziomy dawek należy dobierać z uwzględnieniem wszelkich istniejących danych o toksyczności, jak również dodatkowych informacji dotyczących metabolizmu i toksykokinetyki. Tego rodzaju informacje mogą również pomóc w wykazaniu odpowiedniego doboru reżimu dawkowania.

Należy użyć równoczesnej grupy kontrolnej. Powinna to być grupa kontrolna poddawana pozorowanej terapii lub grupa kontrolna nośnika, jeżeli przy podawaniu substancji testowanej jest stosowany nośnik. Wszystkie grupy winny otrzymywać te same objętości substancji testowanej lub nośnika. Ze zwierzętami grup(-y) kontrolnych(-ej) powinno się obchodzić w sposób identyczny jak ze zwierzętami grupy badanej. Grupie kontrolnej nośnika należy podawać nośnik w największej stosowanej objętości (takiej jak w grupie badanej o najmniejszym poziomie dawki).

▼B

1.6.4. **Badanie graniczne**

Jeżeli badanie przy jednym poziomie dawki równym co najmniej 1 000 mg/dzień/kg masy ciała w podaniu doustnym, stosujący procedury opisane dla tego badania, nie wywołuje widocznych objawów zatrucia u zwierząt ciężarnych ani u ich potomstwa, i jeżeli nie należałoby spodziewać się toksyczności na podstawie istniejących danych (np. dotyczących związków strukturalnie pokrewnych i/lub powiązanych metabolicznie), wtedy pełne badanie przy zastosowaniu trzech poziomów dawkowania może być uznane za niepotrzebne. Przewidywana ekspozycja ludzi może wskazać na potrzebę zastosowania w badaniu granicznym większej dawki doustnej. W odniesieniu do innych dróg podawania, na przykład wziewnej lub stosowania na skórę, własności fizyczne i chemiczne substancji testowanej mogą często wskazywać i ograniczać najwyższy możliwy do osiągnięcia poziom ekspozycji (zastosowanie na skórę, na przykład, nie powinno powodować silnej toksyczności miejscowej).

1.6.5. **Podawanie**

Testowana substancja lub nośnik podawane są zazwyczaj doustnie przez intubację. Jeżeli zostanie zastosowana inna droga podawania, prowadzący badania powinien przedstawić uzasadnienie i racjonalną podstawę wyboru, mogą być również konieczne odpowiednie modyfikacje (2)(3)(4). Testowana substancja powinna być podawana każdego dnia o podobnym czasie.

Dawka dla danego zwierzęcia powinna zwykle opierać się na ostatnim określeniu jego masy ciała. Należy jednak zachować ostrożność, kiedy dostosowuje się dawki w ostatnim trymestrze ciąży. W doborze dawek należy wykorzystać dostępne dane aby zapobiec nadmiernej toksyczności względem matek. Jeśli jednak zostanie zaobserwowana nadmierna toksyczność u matek poddanych terapii, zwierzęta te należy humanitarnie uśmiercić. Jeżeli kilka ciężarnych zwierząt wykazuje oznaki nadmiernej toksyczności, należy rozważyć uśmiercenie zwierząt tej grupy dawkowania. Kiedy substancja podawana jest do żołądka, pożądane jest podawanie w jednorazowej dawce przy użyciu rurki lub odpowiedniej kaniuli dotchawicznej. Maksymalna objętość cieczy, która może być podana jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można użyć 2 ml/100 g masy ciała. W przypadku stosowania jako nośnika oleju kukurydzianego, objętość nie powinna przekraczać 0,4 ml/100 g masy ciała. Zmienność objętości w teście powinna być zminimalizowana przez dostosowanie stężenia, tak aby zapewnić stałą objętość dla wszystkich poziomów dawki.

1.6.6. **Obserwacja matek**

Obserwacje kliniczne powinny być przeprowadzane i odnotowywane co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia w tym samym czasie, biorąc pod uwagę szczytowy okres przewidywanych objawów po dawkowaniu. Stan zdrowia zwierząt powinien być odnotowywany, pod kątem śmiertelności, zachorowalności, odnośnych zmian zachowania i wszelkich objawów widocznej toksyczności.

1.6.7. **Masa ciała i spożycie pożywienia**

Zwierzęta należy zważyć w dniu 0 ciąży lub nie później niż w dniu 3 ciąży, jeżeli zwierzęta kryte w znanym czasie dostarczane są przez hodowcę z zewnątrz, następnie w pierwszym dniu dawkowania, potem co najmniej raz na trzy dni podczas okresu dawkowania oraz w dniu planowanego uśmiercenia.

▼B

Spożycie pożywienia odnotowuje się w odstępach trzydniowych i należy to robić równocześnie z ważeniem zwierząt.

1.6.8. **Sekcja zwłok**

Samice uśmierca się na jeden dzień przed przewidywaną datą porodu. Samice wykazujące objawy poronienia lub porodu przedwczesnego przed datą planowanego uśmiercenia należy uśmiercić i poddać dokładnemu badaniu oglądowemu.

W momencie uśmiercenia lub śmierci w okresie trwania badania matkę należy zbadać oglądowo w kierunku nieprawidłowości strukturalnych lub zmian patologicznych. W celu zminimalizowania błędu systematycznego najlepiej jest, jeżeli oceny matek podczas cięcia cesarskiego oraz następcze analizy płodu prowadzone są przez osoby nieświadome przynależności samicy do grupy poddanej terapii.

1.6.9. **Analiza zawartości macicy**

Bezpośrednio po uśmierceniu, lub tak szybko jak możliwe po śmierci, należy wyciąć macice i ustalić ciężarność. Macice, które wyglądają na niecięzarne należy poddać dalszemu badaniu (np. przy użyciu barwienia siarczkiem amonu w przypadku gryzoni, barwieniem Salewskiego lub inną odpowiednią metodą w przypadku królików) w celu potwierdzenia ich niecięzarnego statusu (5).

Należy zważyć ciężarne macice wraz z szyjką. Nie uzyskuje się wielkości mas ciężarnych macic zwierząt padłych w czasie badania.

U zwierząt ciężarnych należy określić liczbę ciałek żółtych.

Należy zbadać zawartość macicy pod kątem liczby obumarłych zarodków oraz liczby płodów zdolnych do życia. Należy określić stopień resorpcji w celu ustalenia względnego czasu śmierci jaja płodowego (zob. sekcja 1.2).

1.6.10. **Badanie płodów**

Należy określić płeć i ciężar ciała każdego płodu.

Każdy płód bada się w kierunku zmian zewnętrznych (6).

Płody należy zbadać pod kątem zmian w tkance miękkiej i kostnej (np. odchylenia, wady lub nieprawidłowości) (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24). Podział zmian w płodach na kategorie jest pożądany, ale nie jest wymagany. Jeżeli wprowadza się podział na kategorie, należy dokładnie zdefiniować kryteria każdej kategorii. Szczególną uwagę należy zwrócić na drogi rodne, które należy zbadać pod kątem zmian rozwojowych.

W przypadku gryzoni w przybliżeniu połowa każdego miotu powinna zostać wypreparowana i zbadana pod kątem zmian w tkance kostnej. Pozostała część miotu powinna zostać wypreparowana i oceniona pod kątem zmian w tkance miękkiej, z wykorzystaniem przyjętej i właściwej metody cięcia skrawków seryjnych lub z zastosowaniem techniki precyzyjnej sekcji w całości.

▼B

Dla zwierząt innych niż gryzonie, np. królików, należy zbadać wszystkie płody pod kątem zmian w tkance kostnej i miękkiej. Ciała tych płodów oceniane są poprzez precyzyjną sekcję, pod kątem zmian w tkance miękkiej, które może również obejmować procedury oceny wewnętrznej struktury serca (25). Głowy połowy zbadanych w ten sposób płodów odcina się i poddaje procedurze oceny pod kątem zmian w tkance miękkiej (wraz z oczami, mózgiem, przewodami nosowymi i językiem), stosując metody standardowego skrawania seryjnego (26) lub innej metody o podobnej czułości. Ciała tych płodów i pozostałych płodów niebadanych należy przygotować i zbadać pod kątem nieprawidłowości szkieletowych, stosując te same metody jak opisane dla gryzoni.

2. **DANE**

2.1. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Dane należy podawać indywidualnie dla matek oraz ich potomstwa i podsumować w formie tabeli wykazującej, w odniesieniu do każdej grupy badanej i każdego pokolenia, liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt padłych podczas badania lub uśmierconych ze względów humanitarnych, czas zgonu lub humanitarnego uśmiercenia zwierzęcia, liczbę ciężarnych samic, liczbę zwierząt wykazujących zaobserwowane oznaki toksyczności, z podaniem czasu ich pojawienia się, czasu trwania, ciężkości wszelkich skutków toksyczności, rodzajów obserwacji zarodków/płodów oraz wszelkich odnośnych danych miotów.

Wyniki liczbowe należy ocenić właściwą metodą statystyczną, przyjmując miot jako jednostkę w analizie danych. Należy zastosować uznaną metodę statystyczną; wyboru metod statystycznych należy dokonać w ramach projektowania badania i uzasadnić. W sprawozdaniu należy również umieścić dane dotyczące zwierząt, które nie przeżyły do terminu planowanego uśmiercenia. W odpowiednich przypadkach dane te mogą zostać włączone do średnich dla grup. W sprawozdaniu należy również zamieścić dane odnoszące się do zwierząt, które nie przeżyły do daty planowanego uśmiercenia. W stosownych przypadkach dane takie mogą być uwzględniane w średnich dla grup. Znaczenie danych uzyskanych z takich zwierząt, a tym samym ich uwzględnienie lub nieuwzględnienie w średniej (średnich), należy uzasadnić i ocenić indywidualnie dla każdego przypadku.

2.2. OCENA WYNIKÓW

Wyniki badania przeudrodzeniowej toksyczności rozwojowej należy ocenić w odniesieniu do obserwowanych skutków. Ocena obejmuje następujące informacje:

— wyniki badań matek, zarodków/płodów, w tym ocena związku lub jego braku pomiędzy ekspozycją zwierząt na badaną substancję oraz częstość i ciężkość wszelkich zaobserwowanych skutków,

— kryteria zastosowane do wyróżnienia kategorii nieprawidłowości zewnętrznych, nieprawidłowości tkanki miękkiej i nieprawidłowości szkieletowych płodu, jeśli zastosowano kategoryzację,

▼B

— w stosownych przypadkach, wcześniej uzyskane dane kontrolne wspomagające interpretację wyników badania,

— liczby wykorzystane do obliczenia wszystkich danych procentowych lub wskaźników,

— w stosownych przypadkach, odpowiednią analizę statystyczną obejmującą wystarczające informacje dotyczące metody analizy, tak aby niezależny recenzent/statystyk mógł dokonać powtórnej oceny i odtworzyć analizę.

W każdym badaniu, które wykazało brak jakiegokolwiek skutku toksycznego, należy rozważyć dalsze badania absorpcji i biologicznej dostępności testowanej substancji.

2.3. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Badanie przeudrodzeniowej toksyczności rozwojowej dostarcza informacji o skutkach powtarzanej w czasie ciąży ekspozycji matek na daną substancję, jak również o skutkach wywieranych na wewnątrzmaciczny rozwój ich potomstwa. Wyniki badania należy rozpatrywać w połączeniu z wynikami uzyskanymi w badaniach toksyczności podchronicznej, rozrodczej, badaniach toksokinetycznych i innych. Ponieważ nacisk położony jest zarówno na ogólną toksyczność w kategoriach punktów końcowych toksyczności względem matek, jak i toksyczności rozwojowej, wyniki badań pozwolą do pewnego stopnia rozróżnić skutki rozwojowe występujące przy nieobecności toksyczności ogólnej, od wywoływanych tylko na tych poziomach dawkowania, które są toksyczne również dla matki (27).

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań musi zawierać następujące szczegółowe informacje:

Substancja testowana:

— forma fizyczna, oraz, w odpowiednich przypadkach, własności fizykochemiczne,

— identyfikację w tym numer CAS, jeśli jest znany/ustalony,

— czystość.

Nośnik (jeśli był użyty):

— uzasadnienie wyboru nośnika, jeśli jest inny niż woda.

Zwierzęta badane:

— użyty gatunek i szczep,

— liczba i wiek zwierząt,

— źródło, warunki środowiska, pożywienie itp.,

— indywidualna masa ciała zwierząt na początku badania.

Warunki badania:

— racjonalne uzasadnienie doboru poziomu dawek,

— szczegóły formulacji substancji badanej/przygotowywania pożywienia osiągnięte stężenie, stabilność i jednorodność preparatu,

▼B

— szczegóły dotyczące podawania substancji testowej,

— w stosownych przypadkach, przeliczenie stężeń substancji testowej w pożywieniu/wodzie pitnej (ppm) na dawkę rzeczywistą mg/kg masy ciała/dzień),

— warunki środowiskowe,

— szczegóły jakości pożywienia i wody.

Wyniki:

Dane dotyczące toksycznej reakcji matek w rozbiciu na poziomy dawkowania powinny obejmować poniższe, ale nie powinny być do nich ograniczone:

— liczba zwierząt na początku badania, zwierząt, które przeżyły, zwierząt ciężarnych, roniących, liczba zwierząt rodzących przedwcześnie,

— data śmierci podczas doświadczenia lub informacja, że zwierzęta przeżyły do uśmiercenia,

— dane uzyskane dla zwierząt, które nie przeżyły do planowanego uśmiercenia, należy umieścić w sprawozdaniu, ale bez uwzględniania w statystycznych porównaniach między grupowych,

— data obserwacji każdego nieprawidłowego objawu klinicznego i jego dalszego przebiegu,

— masa ciała, zmiana masy ciała i masa ciężarnej macicy, w tym, nieobowiązkowo, zmianę masy ciała skorygowanej względem ciężaru ciężarnej macicy,

— spożycie pokarmu, oraz w wody, w przypadkach gdy jest mierzone,

— stwierdzenia sekcji, w tym masę ciężarnej macicy,

— wartości NOAEL w odniesieniu do skutków względem matek i skutków rozwojowych powinny zostać zamieszczone w sprawozdaniu.

Rozwojowe punkty końcowe w podziale na poziomy dawek, dla miotów z zagnieżdżeniami, obejmujące:

— liczbę ciałek żółtych,

— liczbę zagnieżdżeń i procent żywych i martwych płodów oraz resorpcji,

— liczbę i procent strat przed- i poimplantacyjnych.

Rozwojowe punkty końcowe w podziale na poziomy dawek, dla miotów z żywymi płodami, obejmujące:

— liczbę i procent żywego potomstwa,

— proporcję płci,

— masy ciała płodów, najlepiej w podziale na płci i łącznie dla obu płci,

— wady rozwojowe zewnętrzne, tkanki miękkiej i szkieletu, oraz inne odnośne zmiany,

— w stosownych przypadkach, kryteria podziału na kategorie,

▼B

— całkowitą liczbę i procent płodów i miotów z jakimikolwiek zmianami zewnętrznymi, tkanki miękkiej lub zmianami szkieletowymi, jak również rodzaje i częstości występowania indywidualnych nieprawidłowości i innych odnośnych zmian.

Dyskusja wyników.

Wnioski.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(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; 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; 386–398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 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 undExperimentelle 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; 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; 381–391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47; 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* 127:291–306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313–320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398–408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 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; 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*; pp. 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; 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; 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; 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; 181–188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, JL. L 216/234 EN Official Journal of the European Union 16.6.2004.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,*

(23) Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 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; 233–239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 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, pp. 126–144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798–63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249–292.

▼M4

B.32. **BADANIA RAKOTWÓRCZOŚCI**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 451 (2009). Pierwotny tekst TG 451 dotyczącej badań rakotwórczości przyjęto w 1981 r. Opracowanie niniejszej zmienionej metody badawczej B.32 uznano za konieczne w celu odzwierciedlenia ostatnich zmian w dziedzinie dobrostanu zwierząt i wymogów regulacyjnych (2) (3) (4) (5) (6). Aktualizację niniejszej metody badawczej B.32 przeprowadzono równolegle z modyfikacjami rozdziału B.30 niniejszego załącznika, dotyczącego badań toksyczności przewlekłej, oraz rozdziału B.33 niniejszego załącznika, dotyczącego łączonych badań toksyczności przewlekłej/rakotwórczości, w celu uzyskania dodatkowych informacji pochodzących od zwierząt wykorzystywanych w badaniu oraz zapewnienia dalszych szczegółowych informacji na temat doboru dawek. Niniejszą metodę badawczą B.32 opracowano w celu jej wykorzystywania w badaniach szerokiego zakresu chemikaliów, w tym pestycydów i chemikaliów przemysłowych. Należy zauważyć jednak, że niektóre dane szczegółowe i wymogi mogą różnić się w przypadku produktów farmaceutycznych (zob. wytyczne S1B dotyczące badania produktów farmaceutycznych pod kątem rakotwórczości Międzynarodowej Konferencji ds. Harmonizacji (ICH)).

2. Większość badań rakotwórczości przeprowadza się z wykorzystaniem gatunków gryzoni, w związku z czym niniejsza metoda badawcza przewidziana jest do stosowania przede wszystkim w badaniach z wykorzystaniem takich gatunków. W przypadku konieczności przeprowadzenia takich badań z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie należy zastosować zasady i procedury określone w niniejszej metodzie badawczej, wraz z zasadami i procedurami określonymi w rozdziale B.27 niniejszego załącznika, dotyczącym 90-dniowego badania toksyczności doustnej wywołanej powtarzanym dawkowaniem z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie (6), przy wprowadzeniu odpowiednich modyfikacji. Dalsze wytyczne są dostępne w wytycznych OECD nr 116 dotyczących opracowywania i przeprowadzania badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (7).

3. Trzy główne drogi podania stosowane w badaniach rakotwórczości to droga pokarmowa, dermalna i inhalacyjna. Wybór drogi podania zależy od fizycznych i chemicznych właściwości substancji badanej oraz głównej drogi narażenia ludzi. Dodatkowe informacje na temat wyboru drogi narażenia przedstawiono w wytycznych nr 116 (7).

4. W ramach niniejszej metody badawczej kładzie się nacisk na narażenie drogą pokarmową, która jest drogą najczęściej stosowaną w badaniach rakotwórczości. Przeprowadzenie badań rakotwórczości obejmujących narażenie drogą dermalną lub inhalacyjną może być również konieczne do oceny ryzyka dla zdrowia ludzi lub wymagane w ramach pewnych systemów regulacji, obydwie te drogi narażenia wymagają jednak badań znacznie złożonych technicznie. Takie badania będą musiały zostać opracowane dla poszczególnych przypadków, jednak opisana w niniejszym rozdziale metoda badawcza mająca na celu ocenę i oszacowanie rakotwórczości przy pokarmowej drodze podania może stanowić podstawę dla protokołu badania z zastosowaniem inhalacyjnej lub dermalnej drogi podania, z zastrzeżeniem zaleceń dotyczących okresów poddawania działaniu substancji, parametrów klinicznych, parametrów analizy patologicznej itp. Dostępne są wytyczne OECD dotyczące podawania substancji badanych drogą dermalną (7) i drogą inhalacyjną (7) (8). Podczas opracowywania badań uwzględniających dłuższy okres narażenia drogą inhalacyjną należy w szczególności wziąć pod uwagę rozdział B.8 niniejszego załącznika (9) oraz rozdział B.29 niniejszego załącznika (10), a także wytyczne OECD dotyczące badania ostrej toksyczności inhalacyjnej (8). W przypadku badań przeprowadzanych drogą dermalną należy uwzględnić rozdział B.9 niniejszego załącznika (11).

▼M4

5. Badanie rakotwórczości dostarcza informacji na temat potencjalnych zagrożeń dla zdrowia, których pojawienie się jest prawdopodobne w przypadku powtarzającego się narażenia przez okres trwający nawet przez całą długość życia wykorzystanego w badaniu gatunku. Badanie dostarczy informacji na temat skutków toksycznych substancji badanej, w tym na temat potencjalnej rakotwórczości, i może wskazać organy docelowe i możliwość akumulacji. Badanie może także dostarczyć szacunkowych informacji na temat poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian w kontekście skutków toksycznych oraz, w przypadku niegenotoksycznych substancji rakotwórczych, w odniesieniu do reakcji guzów, które to informacje można wykorzystać do ustalenia kryteriów bezpieczeństwa dla narażenia ludzi. Podkreśla się również konieczność uważnych obserwacji klinicznych zwierząt, aby uzyskać możliwie jak najwięcej informacji.

6. Cele badań rakotwórczości w ramach niniejszej metody badawczej obejmują:

— określenie właściwości rakotwórczych substancji badanej, skutkujących zwiększonym występowaniem nowotworów, zwiększonym odsetkiem nowotworów złośliwych lub szybszym wystąpieniem nowotworów, w porównaniu z równoległą grupą kontrolną,

— określenie organu lub organów docelowych rakotwórczości,

— określenie czasu, po którego upływie pojawiają się nowotwory,

— scharakteryzowanie zależności dawka-odpowiedź w odniesieniu do guzów,

— określenie poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL) lub punktu wyjścia dla ustalenia dawki wyznaczającej (BMD),

— ekstrapolacja skutków rakotwórczych do poziomów narażenia ludzi przy niskich dawkach,

— pozyskanie danych do zbadania hipotez dotyczących sposobu działania (2) (7) (12) (13) (14) (15).

WSTĘPNE ROZWAŻANIA

7. Podczas oceny i oszacowania potencjalnej rakotwórczości substancji badanej laboratorium badawcze powinno rozważyć wszystkie dostępne informacje na temat substancji badanej przed rozpoczęciem badania, w celu opracowania takiego projektu badania, który umożliwi zbadanie potencjalnej rakotwórczości w sposób bardziej efektywny oraz zminimalizuje wykorzystanie zwierząt. Szczególnie istotne są informacje na temat sposobu działania substancji, co do której podejrzewa się, że jest substancją rakotwórczą, oraz uwzględnienie takiego sposobu działania (2) (7) (12) (13) (14) (15), ponieważ optymalny projekt badania może różnić się w zależności od tego, czy substancja badana jest znaną genotoksyczną substancją rakotwórczą, czy też substancją, co do której podejrzewa się działanie genotoksyczne i rakotwórcze. Dalsze wytyczne na temat kwestii dotyczących sposobu działania można znaleźć w wytycznych nr 116 (7).

8. Informacje, które będą pomocne w opracowywaniu projektu badania, obejmują tożsamość, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne substancji badanej; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*, w tym badań genotoksyczności; spodziewane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR, mutagenności/genotoksyczności, rakotwórczości oraz inne dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie powiązanych związków; dostępne dane toksykokinetyczne (jeśli dostępne, dane dotyczące kinetyki jednorazowego podania i podania powtórzonego) oraz dane pochodzące z innych badań narażenia powtarzanego. Ocenę rakotwórczości należy przeprowadzić wyłącznie po uzyskaniu

▼M4

wstępnych informacji na temat toksyczności na podstawie 28-dniowych lub 90-dniowych badań toksyczności wywołanej podaniem powtórzonym. Użytecznych informacji mogą dostarczyć także krótkoterminowe badania dotyczące inicjacji i promocji w kontekście rakotwórczości. W kontekście badania rakotwórczości należy rozważyć podejście oparte na etapach, w ramach ogólnej oceny potencjalnych niepożądanych skutków dla zdrowia wywoływanych przez daną substancję badaną (16) (17) (18) (19).

9. Metody statystyczne najbardziej odpowiednie do analizy wyników, przy uwzględnieniu układu doświadczalnego i celów badania, należy ustalić przed rozpoczęciem badania. Wśród kwestii, jakie należy rozważyć, znajduje się pytanie, czy dane statystyczne powinny zawierać korektę uwzględniającą zwierzęta, które przeżyły, analizę łącznego ryzyka wystąpienia guza w odniesieniu do okresu przeżycia, analizę tego, jak szybko wystąpił guz, oraz analizę w przypadku przedwczesnego uśmiercenia jednej grupy lub większej liczby grup. Wytyczne dotyczące odpowiednich analiz statystycznych i kluczowych odniesień do uznanych na świecie metod statystycznych zawarto w wytycznych nr 116 (7), a także wytycznych nr 35 dotyczących analizy i ewaluacji badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (20).

10. Podczas przeprowadzania badania rakotwórczości należy w każdym przypadku kierować się głównymi zasadami i rozważaniami przedstawionymi w wytycznych OECD nr 19 dotyczących rozpoznawania, oceny i stosowania objawów klinicznych jako humanitarnego punktu końcowego w odniesieniu do zwierząt wykorzystywanych w badaniu oceny bezpieczeństwa (21), a zwłaszcza pkt 62 tego dokumentu. Punkt ten stanowi, że: „*W badaniach z zastosowaniem powtarzanej dawki, jeśli zwierzę wykazuje objawy kliniczne, które postępują, prowadząc do dalszego pogorszenia jego stanu, należy podjąć uzasadnioną decyzję, czy w sposób humanitarny uśmiercić takie zwierzę. Taka decyzja powinna opierać się na rozważeniu wartości informacji, jakie można uzyskać dzięki dalszemu utrzymywaniu takiego zwierzęcia w ramach badania, i uwzględniać ogólny stan takiego zwierzęcia. Jeśli zapadnie decyzja o pozostawieniu takiego zwierzęcia w badaniu, częstotliwość obserwacji należy w razie potrzeby zwiększyć. Można także tymczasowo zaprzestać dawkowania, jeśli nie wpłynie to w sposób niekorzystny na cel badania, a zmniejszy cierpienie lub stres odczuwany przez zwierzę, lub też można zmniejszyć podawaną dawkę*”.

11. Szczegółowe wytyczne dotyczące zasad doboru dawek w przypadku badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości, a także omówienie takich zasad, można znaleźć w wytycznych nr 116 (7), oraz w publikacjach Międzynarodowego Instytutu Nauk Biologicznych (ILSI) (22) (23). Główna strategia doboru dawek zależy od głównego celu lub celów badania (pkt 6). Podczas doboru odpowiednich poziomów dawek należy zachować równowagę między kontrolą zagrożenia a określeniem reakcji na niskie dawki i ich istotnością. Ma to szczególne znaczenie w sytuacji, w której planuje się przeprowadzić łączone badanie toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (rozdział B.33 niniejszego załącznika) (pkt 12).

12. Należy rozważyć przeprowadzenie łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (rozdział B.33 niniejszego załącznika), zamiast przeprowadzenia osobno badania toksyczności przewlekłej (rozdział B.30 niniejszego załącznika) i badania rakotwórczości (niniejsza metoda badawcza B.32). W porównaniu z przeprowadzaniem dwóch osobnych badań łączone badanie zapewnia większą efektywność pod względem czasu i kosztów, a jednocześnie nie obniża jakości danych, czy to na etapie badania toksyczności przewlekłej, czy też na etapie badania rakotwórczości. Przy przeprowadzaniu łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (rozdział B.33 niniejszego załącznika) należy jednak zwrócić szczególną uwagę na zasady doboru dawek (pkt 11 i 22–25), a także uznaje się, że w przypadku pewnych ram regulacyjnych wymagane może być przeprowadzenie takich badań osobno.

▼M4

13. Definicje stosowane w kontekście niniejszej metody badawczej można znaleźć na końcu tego rozdziału oraz w wytycznych nr 116 (7).

ZASADA BADANIA

14. Substancję badaną podaje się codziennie w dawkach stopniowanych kilku grupom zwierząt badanych przez większą część długości ich życia, zazwyczaj drogą pokarmową. Właściwe może być także badanie przy zastosowaniu drogi inhalacyjnej lub dermalnej. Zwierzęta obserwuje się uważnie w celu wykrycia objawów toksyczności i pojawienia się zmian nowotworowych. Zwierzęta, które zginą lub zostaną uśmiercone podczas badania, są poddawane sekcji zwłok, a zwierzęta, które przeżyją, są, po zakończeniu badania, uśmiercane i poddawane sekcji zwłok.

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

15. Niniejsza metoda badawcza obejmuje przede wszystkim ocenę i oszacowanie rakotwórczości u gryzoni (pkt 2). Wykorzystanie gatunków innych niż gryzonie można rozważyć, jeśli dostępne dane wskazują, że takie gatunki są bardziej odpowiednie w kontekście określenia skutków dla zdrowia u ludzi. Wybór gatunku należy uzasadnić. Preferowanym gatunkiem gryzoni jest szczur, można jednak wykorzystać także inne gatunki, np. mysz. Choć w przeszłości wykorzystanie myszy w badaniach rakotwórczości mogło ograniczać użyteczność takich badań (24) (25) (26), w ramach niektórych obowiązujących przepisów nadal wymaga się badania rakotwórczości z wykorzystaniem myszy, o ile nie ustalono, że takie badanie nie jest konieczne z naukowego punktu widzenia. Szczury i myszy są jak dotąd preferowanymi modelami doświadczalnymi z uwagi na ich względnie krótką długość życia, powszechne wykorzystywanie w badaniach farmakologicznych i toksykologicznych, podatność na powstawanie guzów, a także dostępność dostatecznie scharakteryzowanych szczepów. Z racji tych cech dostępne są znaczne ilości informacji na temat ich fizjologii i patologii. Dodatkowe informacje na temat wyboru gatunku i szczepu przedstawiono w wytycznych nr 116 (7).

16. Zaleca się wykorzystanie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt pochodzących ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach. Badanie rakotwórczości należy przeprowadzić najlepiej z wykorzystaniem zwierząt z tego samego szczepu i źródła, z którego pochodziły zwierzęta wykorzystane we wstępnym badaniu lub wstępnych badaniach toksyczności o krótszym czasie trwania, niemniej jednak, jeśli wiadomo, że w przypadku zwierząt z danego szczepu i źródła pojawiają się problemy z osiągnięciem powszechnie przyjętego kryterium przeżycia w badaniach długoterminowych [zob. wytyczne nr 116 (7)], należy rozważyć wykorzystanie szczepu zwierząt, który charakteryzuje się akceptowalnym wskaźnikiem przeżycia w przypadku badań długoterminowych. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży.

Warunki przetrzymywania i karmienia

17. Zwierzęta można przetrzymywać pojedynczo lub w klatkach w małych grupach składających się z osobników tej samej płci; przetrzymywanie zwierząt pojedynczo należy rozważyć, wyłącznie jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia (27) (28) (29). Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Temperatura w pomieszczeniach badawczych, w których przetrzymuje się zwierzęta, powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, by poza czasem czyszczenia pomieszczenia nie przekraczała 70 %, należy dążyć do utrzymania jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Pasza powinna spełniać wszystkie wymogi związane z odżywianiem badanych gatunków, a obecna w niej zawartość pokarmowych

▼M4

substancji zanieczyszczających, w tym między innymi pozostałości pestycydów, trwałych zanieczyszczeń organicznych, fitoestrogenów, metali ciężkich i mikotoksyn, które mogą wpłynąć na wynik badania, powinna być możliwie jak najniższa. Okresowo należy generować informacje analityczne na temat poziomów składników odżywczych i pokarmowych substancji zanieczyszczających, a przynajmniej na początku badania oraz w przypadku zmiany stosowanej partii. Takie informacje należy uwzględnić w sprawozdaniu końcowym. Informacje analityczne na temat wody pitnej stosowanej w badaniu należy przedstawić w podobny sposób. Na wybór pokarmu może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej mieszaniny substancji badanej, a także potrzeba spełnienia wymogów związanych z odżywianiem zwierząt, jeśli substancję badaną podaje się wraz z pokarmem.

Przygotowanie zwierząt

18. Należy wykorzystać zdrowe zwierzęta aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez okres co najmniej 7 dni, oraz niepoddawane wcześniej procedurom badawczym. W przypadku gryzoni dawkowanie substancji zwierzętom należy rozpocząć możliwie jak najszybciej po odsadzeniu i aklimatyzacji, oraz najlepiej zanim zwierzęta osiągną wiek 8 tygodni. Badane zwierzęta należy scharakteryzować ze względu na ich gatunek, szczep, źródło, płeć, wagę i wiek. W chwili rozpoczęcia badania odchylenia masy dla obu płci wykorzystanych zwierząt powinny być minimalne i nie przekraczać ± 20 % średniej masy wszystkich zwierząt wykorzystanych w ramach badania, osobno dla każdej płci. Należy losowo przydzielić zwierzęta do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu substancji badanej. Po randomizacji między grupami nie powinno być znaczących różnic w średniej wadze osobników w odniesieniu do obu płci. Jeśli odnotowano statystycznie istotne różnice, randomizację należy powtórzyć, jeśli jest to możliwe. Każdemu zwierzęciu należy przydzielić niepowtarzalny numer identyfikacyjny i w sposób stały oznaczyć je tym numerem poprzez jego wytatuowanie, wszczepienie implantu z chipem lub za pomocą innej odpowiedniej metody.

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

19. Należy wykorzystać zwierzęta obu płci. Należy wykorzystać wystarczającą liczbę zwierząt, aby umożliwić szczegółowe szacunki z punktu widzenia biologicznego i statystycznego. W związku z powyższym każda grupa otrzymująca dawki oraz równoległa grupa kontrolna powinny liczyć co najmniej 50 zwierząt każdej płci. W zależności od celu badania można zwiększyć moc statystyczną kluczowych szacunków poprzez zróżnicowane przydzielenie zwierząt nierównomiernie do grup otrzymujących różne dawki, przy czym w grupach otrzymujących niskie dawki powinno być więcej niż 50 zwierząt; np. w celu oszacowania rakotwórczości przy niskich dawkach. Należy jednak pamiętać, że umiarkowane zwiększenie liczebności grupy oznacza względnie niewielkie zwiększenie mocy statystycznej badania. Więcej informacji na temat projektu badania pod względem statystycznym oraz doboru poziomów dawek w celu zmaksymalizowania mocy statystycznej zawarto w wytycznych nr 116 (7).

Ustalenia dotyczące uśmiercania w trakcie trwania doświadczenia oraz grup satelitarnych (wskaźnikowych)

20. W ramach badania można założyć uśmiercanie zwierząt w trakcie trwania doświadczenia, np. po upływie 12 miesięcy, w celu uzyskania informacji na temat progresji zmian nowotworowych oraz informacji dotyczących mechanizmu działania, jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia. Jeśli takie informacje są już dostępne dzięki poprzednim badaniom toksyczności dawki powtórzonej substancji badanej, uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia może nie być uzasadnione z naukowego punktu widzenia. Jeśli projekt badania przewiduje uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia, liczba zwierząt w każdej grupie otrzymującej dawki przeznaczona do uśmiercenia w trakcie trwania doświadczenia będzie wynosić zazwyczaj 10 zwierząt każdej płci, zaś całkowitą liczbę zwierząt przewidzianych w projekcie badania należy zwiększyć o liczbę zwierząt przeznaczonych do uśmiercenia przed zakończeniem badania. W celu monitorowania w trakcie badania, w razie konieczności, statusu choroby, można uwzględnić dodatkową grupę zwierząt wskaźnikowych (zazwyczaj 5 zwierząt każdej płci) (30). Dalsze wytyczne przedstawiono w wytycznych nr 116 (7).

▼M4

Grupy otrzymujące dawki oraz dawkowanie

21. Wytyczne dotyczące wszystkich aspektów doboru dawek oraz zróżnicowania poziomu dawek zawarto w wytycznych nr 116 (7). Należy zastosować co najmniej trzy poziomy dawek oraz ustanowić równoległą grupę kontrolną. Poziomy dawek będą zazwyczaj oparte na wynikach krótkoterminowych badań z powtarzanym dawkowaniem lub badań ustalających zakres dawkowania oraz należy uwzględnić w tym kontekście wszelkie istniejące dane toksykologiczne i toksykokinetyczne dostępne w odniesieniu do substancji badanej lub substancji powiązanych.

22. O ile nie ogranicza tego fizykochemiczny charakter biologicznych skutków działania substancji badanej, należy wybrać najwyższy poziom dawki w celu określenia głównych organów docelowych oraz skutków toksycznych, jednocześnie unikając cierpienia, toksyczności ostrej, chorobowości lub śmierci. Uwzględniając czynniki przedstawione w pkt 23 poniżej, należy zazwyczaj wybrać najwyższy poziom dawki w celu uzyskania dowodów na toksyczność, potwierdzonych, na przykład, wolniejszym przybieraniem na wadze (o około 10 %). W zależności od celów badania (zob. pkt 6) można wybrać górną dawkę, niższą od dawki potwierdzającej toksyczność, np. jeśli dawka powoduje niekorzystny skutek istotny dla badania, który ma jednak niewielki wpływ na długość życia czy wagę ciała.

23. Poziomy dawek i zróżnicowanie ich poziomów można dobrać tak, by określić odpowiedź zależną od dawki oraz, w zależności od sposobu działania substancji badanej, NOAEL lub inny pożądany wynik badania, np. BMD (zob. pkt 25) przy najniższym poziomie dawki. Przy stosowaniu niższych dawek należy rozważyć takie czynniki, jak spodziewane nachylenie krzywej dawka-odpowiedź, dawki, przy których mogą pojawić się istotne zmiany w metabolizmie, lub charakter działania toksycznego, przy którym oczekuje się wartości granicznej lub punktu wyjścia dla ekstrapolacji dla niskiej dawki.

24. Wybrane zróżnicowanie poziomów dawki będzie zależeć od właściwości substancji badanej i nie może zostać z góry określone w metodzie badawczej, jednak zastosowanie dwóch do czterech odstępów pomiędzy kolejnym dawkowaniem często zapewnia dobre wyniki badania dla ustalenia malejących poziomów dawki, a dodanie czwartej grupy badanej jest często rozwiązaniem preferowanym w porównaniu ze stosowaniem bardzo dużych interwałów między dawkowaniem (np. współczynnik większy niż 6–10). Zasadniczo należy unikać stosowania współczynników większych niż 10, a w przypadku ich zastosowania należy je uzasadnić.

25. Jak omówiono to w wytycznych OECD nr 116 (7), kwestie, jakie należy rozważyć przy doborze dawki, obejmują:

— znane lub podejrzewane nieliniowości lub punkty przegięcia krzywej dawka-odpowiedź,

— toksykokinetykę oraz zakresy dawkowania, przy których występuje lub nie występuje indukcja metaboliczna, nasycenie lub też nieliniowość między zewnętrznymi a wewnętrznymi dawkami,

— zmiany prekursorowe, markery skutku, lub wskaźniki działania kluczowych podstawowych procesów biologicznych,

— kluczowe (lub podejrzewane) aspekty sposobu działania, takie jak dawki, przy których zaczyna pojawiać się cytotoksyczność, zakłócone zostają poziomy hormonów, przestają działać mechanizmy homeostatyczne itp.,

▼M4

— regiony krzywej dawka-odpowiedź, gdzie konieczne są szczególnie solidne szacunki, np. w zakresie spodziewanej BMD lub podejrzewanej wartości granicznej,

— uwzględnienie spodziewanych poziomów narażenia ludzi.

26. Grupa kontrolna powinna być grupą niepoddawaną działaniu substancji badanej lub grupą kontrolną nośnika, jeśli do podawania substancji badanej zastosowano nośnik. Z wyjątkiem poddawania działaniu substancji badanej, zwierzęta z grupy kontrolnej należy traktować w sposób identyczny ze sposobem traktowania osobników z grup badanych. Jeśli zastosowano nośnik, grupa kontrolna otrzymuje nośnik w najwyższej objętości stosowanej wśród grup otrzymujących dawki. Jeśli substancję badaną podaje się wraz z pokarmem i jeśli powoduje ona znacznie zmniejszone pobranie pokarmu z powodu jego obniżonych wartości smakowych, pomocna może być dodatkowa grupa kontrolna zwierząt otrzymujących pokarm w ilości spożywanej przez zwierzęta z grupy badanej (pair-fed), która zapewni odpowiedniejszą kontrolę.

Przygotowanie dawek i podanie substancji badanej

27. Substancję badaną zazwyczaj podaje się drogą pokarmową, wraz z pokarmem lub wodą pitną, lub też za pomocą sondy. Dodatkowe informacje na temat dróg i metod podania przedstawiono w wytycznych nr 116 (7). Droga i metoda podania zależą od celu badania, fizykochemicznych właściwości substancji badanej, jej biodostępności oraz głównej drogi i metody narażenia ludzi. Należy przedstawić uzasadnienie wybranej drogi i metody podania. W trosce o dobrostan zwierząt należy w normalnych warunkach wybrać sondę żołądkową wyłącznie dla tych substancji, dla których taka droga i metoda podania w sposób uzasadniony odzwierciedlają potencjalne narażenie ludzi (np. produkty farmaceutyczne). Substancje występujące w pokarmie lub środowisku naturalnym, w tym pestycydy, podaje się zazwyczaj wraz z pokarmem lub wodą pitną. W przypadku jednak niektórych scenariuszy, np. narażenia zawodowego, podawanie substancji za pomocą innych dróg może być bardziej właściwe.

28. W razie potrzeby substancję badaną rozpuszcza się lub sporządza się jej zawiesinę w odpowiednim nośniku. W stosownych przypadkach należy wziąć pod uwagę następujące cechy nośnika i innych dodatków: wpływ na wchłanianie, dystrybucję, metabolizm oraz zatrzymywanie substancji badanej; wpływ na chemiczne własności substancji badanej, które mogą zmienić jej charakterystykę toksyczną; oraz wpływ na spożycie pokarmu lub wody, lub też na stan odżywienia zwierząt. Zaleca się, w miarę możliwości, najpierw rozważyć zastosowanie roztworu wodnego/zawiesiny, następnie roztworu/emulsji w oleju (np. z zastosowaniem oleju kukurydzianego), a potem możliwego roztworu w innych nośnikach. W przypadku nośników innych niż woda charakterystyka toksyczna nośnika powinna być znana. Dostępne powinny być także informacje na temat stabilności substancji badanej oraz jednorodności roztworów dawek lub pokarmu z dawkami (w zależności od sytuacji) w warunkach podawania (np. pokarm).

29. W przypadku substancji podawanych w pokarmie lub wodzie pitnej ważne jest dopilnowanie, by ilości substancji badanej nie zakłócały prawidłowej równowagi odżywiania lub spożycia wody. W przypadku długoterminowych badań toksyczności z zastosowaniem podawania dawek wraz z pokarmem stężenie substancji badanej w paszy nie powinno w normalnych warunkach przekraczać górnego limitu 5 % całego pokarmu, aby uniknąć zakłócenia równowagi odżywiania. Przy podawaniu substancji badanej wraz z pokarmem można zastosować stałe stężenie w pokarmie (mg/kg pokarmu lub ppm) lub też stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia (mg/kg masy ciała), obliczany cotygodniowo. Należy określić, które rozwiązanie zastosowano.

▼M4

30. Przy podawaniu substancji drogą pokarmową zwierzętom podaje się dawki substancji badanej codziennie (siedem dni w tygodniu), zazwyczaj przez okres 24 miesięcy w przypadku gryzoni (zob. także pkt 32). Zastosowanie innego systemu dawkowania, np. przez pięć dni w tygodniu, należy uzasadnić. Przy podawaniu substancji drogą dermalną zwierzęta zazwyczaj poddaje się działaniu substancji badanej przez co najmniej 6 godzin dziennie, 7 dni w tygodniu, zgodnie z rozdziałem B.9 niniejszego załącznika (11), przez okres 24 miesięcy. Narażenie drogą inhalacyjną stosuje się przez 6 godzin dziennie, 7 dni w tygodniu, ale możliwe jest zastosowanie narażenia także przez 5 dni w tygodniu, jeśli zostanie to uzasadnione. Okres narażenia zazwyczaj wynosi 24 miesiące. Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu wyłącznie poprzez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować tak, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. W przypadku stosowania okresu narażenia krótszego niż 6 godzin dziennie należy przedstawić stosowne uzasadnienie. Zob. również rozdział B.8 niniejszego załącznika (9).

31. Jeśli substancję badaną podaje się zwierzętom za pomocą sondy, należy dokonywać tego z użyciem sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej, każdego dnia o podobnych porach. Zazwyczaj podaje się pojedynczą dawkę raz dziennie; jeśli jednak substancja jest, na przykład, substancją wykazującą miejscowe działanie drażniące, możliwe jest zachowanie dziennej mocy dawki poprzez podawanie jej jako dawki dzielonej (dwa razy dziennie). Maksymalna objętość cieczy, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość taka powinna być możliwie jak najniższa i nie powinna w normalnych warunkach przekraczać 1 ml/100 g masy ciała w przypadku gryzoni (31). Zmienność stosowanej objętości należy zminimalizować poprzez dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość przy wszystkich poziomach dawek. Wyjątkiem są substancję potencjalnie żrące lub wykazujące działanie drażniące, które należy rozcieńczyć w celu uniknięcia miejscowych ostrych skutków. Należy unikać badania z użyciem stężeń, które mogą być żrące lub wykazujące działanie drażniące dla przewodu pokarmowego.

Czas trwania badania

32. W przypadku gryzoni czas trwania badania będzie zazwyczaj wynosił 24 miesiące, co stanowi większą część standardowej długości życia zwierząt, które mają zostać wykorzystane w takim badaniu. Można ustalić dłuższy lub krótszy czas trwania badania w zależności od długości życia szczepu gatunku zwierząt wykorzystanego w badaniu, taką decyzję należy jednak uzasadnić. W przypadku pewnych szczepów myszy, np. szczepów AKR/J, C3H/J lub C57BL/6J, właściwszy może być czas trwania badania wynoszący 18 miesięcy. Poniżej znajdują się pewne wytyczne dotyczące czasu trwania i zakończenia badania oraz przeżycia; dalsze wytyczne, w tym rozważenia dotyczące dopuszczalności rakotwórczości ujemnie powiązanej z przeżyciem, przedstawiono w wytycznych OECD nr 116 dotyczących opracowywania i przeprowadzania badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (7).

— Zakończenie badania należy rozważyć, jeśli liczba osobników, które pozostały przy życiu w grupach otrzymujących niższe dawki lub grupie kontrolnej, spadnie poniżej 25 %.

— Jeśli wyłącznie osobniki z grupy otrzymującej wysokie dawki padną przedwcześnie z powodu toksyczności, nie powinno to powodować zakończenia badania.

— Przeżycie osobników obu płci należy rozważyć osobno.

— Nie należy przedłużać badania, jeśli dane dostępne dzięki badaniu stały się niewystarczające, aby umożliwić oszacowanie wiarygodne pod względem statystycznym.

▼M4

OBSERWACJE

33. Wszystkie zwierzęta należy sprawdzić pod kątem chorobowości i upadkowości, zazwyczaj na początku i pod koniec każdego dnia, włącznie z weekendami i dniami wolnymi od pracy. Dodatkowo zwierzęta należy sprawdzać raz dziennie pod kątem szczególnych objawów istotnych z toksykologicznego punktu widzenia, a w przypadku podawania substancji poprzez sondę, uwzględniając okres szczytowego występowania spodziewanych skutków po podaniu dawki. Szczególną uwagę należy zwrócić na rozwój guzów; należy odnotować czas pojawienia się guza, jego położenie, wymiary, wygląd oraz progresję każdego wyraźnie widocznego lub wyczuwalnego guza.

Masa ciała, spożycie pokarmu/wody i wydajność pokarmu

34. Wszystkie zwierzęta należy zważyć na początku rozpoczęcia poddawania ich działaniu substancji badanej, a także co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Pomiarów spożycia pokarmu i wydajności pokarmu należy dokonywać co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Spożycie wody należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu, jeśli substancję badaną podaje się wraz z wodą pitną. Pomiary spożycia wody należy rozważyć także w przypadku badań, w których zaszły zmiany związane ze spożyciem wody.

Hematologia, biochemia kliniczna i inne pomiary

35. W celu zmaksymalizowania informacji uzyskanych dzięki badaniu, zwłaszcza na temat kwestii związanych ze sposobem działania, próbki krwi można poddać analizie pod kątem hematologii i biochemii klinicznej, według uznania kierownika badania. Właściwe może być także przeprowadzenie analizy moczu. Dalsze wytyczne dotyczące wartości pobrania takich próbek w ramach badania rakotwórczości przedstawiono w wytycznych nr 116 (7). Jeśli uznano to za właściwe, pobranie próbek krwi na potrzeby oznaczenia hematologicznego i oznaczenia parametrów biochemii klinicznej, a także analizę moczu, można przeprowadzić w ramach uśmiercania w trakcie trwania doświadczenia (pkt 20) oraz wraz z zakończeniem badania, z wykorzystaniem co najmniej 10 zwierząt każdej płci i z każdej grupy. Próbki krwi należy pobrać z określonego miejsca, na przykład poprzez nakłucie serca lub z zatoki oczodołowej tylnej, w znieczuleniu, oraz w stosownych przypadkach przechowywać we właściwych warunkach. Do zbadania można przygotować również rozmazy krwi, zwłaszcza jeśli organem docelowym wydaje się szpik kostny, choć wartość takiego badania w celu oceny rakotwórczości/potencjału onkogenicznego została zakwestionowana (32).

PATOLOGIA

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

36. Wszystkie zwierzęta wykorzystane w badaniu, prócz zwierząt wskaźnikowych (zob. pkt 20) oraz innych zwierząt satelitarnych, należy poddać pełnemu, szczegółowemu rozpoznaniu histopatologicznemu, które obejmuje staranne zbadanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszystkich otworów, jamy czaszki, jamy klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Zwierzęta wskaźnikowe i inne zwierzęta satelitarne mogą wymagać rozpoznania histopatologicznego w zależności od poszczególnych przypadków, według uznania kierownika badania. Masa organów nie jest zazwyczaj częścią badania rakotwórczości, jako że w organach zachodzą zmiany związane z wiekiem, a rozwój guzów na późniejszych etapach uniemożliwia wykorzystanie takich danych. Takie dane mogą mieć jednak kluczowe znaczenie dla oszacowania wagi dowodów, w szczególności w kontekście kwestii związanych ze sposobem działania. Jeśli stanowią one część badania satelitarnego, takie dane należy zgromadzić nie później niż rok po rozpoczęciu badania.

▼M4

37. Następujące tkanki należy zachować w roztworze utrwalającym najbardziej odpowiednim zarówno dla rodzaju tkanki, jak i planowanego późniejszego badania histopatologicznego (33) (tkanki podane w nawiasach kwadratowych są opcjonalne):

wszystkie wyraźne zmiany	serce	trzustka	żołądek (przedżołądek, żołądek gruczołowy)
nadnercze	jelito kręte	przytarczyca	[zęby]
aorta	jelito czcze	nerw obwodowy	jądro
mózg (w tym części kresomózgowia, móżdżka i rdzenia/mostu)	nerka	przysadka	grasica
jelito ślepe	gruczoł łzowy	prostata	tarczyca
szyjka macicy	wątroba	odbytnica	[język]
gruczoł koagulujący	płuco	gruczoł ślinowy	tchawica
okrężnica	węzły chłonne (powierzchowne i głębokie)	pęcherzyk nasienny	pęcherz moczowy
dwunastnica	gruczoł mlekowy (obowiązkowo w przypadku samic oraz, jeśli wyraźnie nadaje się do analizy, również w przypadku samców)	mięsień szkieletowy	macica (w tym szyjka macicy)
najądrze	[górne drogi oddechowe, w tym nos, małżowiny nosowe oraz zatoki przynosowe]	skóra	[moczowód]
oko (w tym siatkówka)	przełyk	rdzeń kręgowy (na trzech odcinkach: szyjnym, śródpiersiowym i lędźwiowym)	[cewka moczowa]
[kość udowa ze stawem]	[opuszka węchowa]	śledziona	pochwa
pęcherzyk żółciowy (w przypadku gatunków innych niż szczur)	jajnik	[mostek]	odcinek szpiku kostnego lub świeżego aspiratu szpiku kostnego
gruczoł przyoczny			

W przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy utrwalić obydwa organy. Wyniki badań klinicznych i innych badań mogą wskazać na konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Organy uznane za prawdopodobne organy docelowe, w oparciu o znane właściwości substancji badanej, także należy zachować. W przypadku badań z zastosowaniem dermalnej drogi podania należy utrwalić organy zgodnie z listą określoną dla podania drogą pokarmową, przy czym kluczowe jest pobranie i zachowanie próbek skóry z miejsca aplikacji. W przypadku badań z zastosowaniem inhalacyjnej drogi podania, układając listę tkanek z dróg oddechowych do zachowania i zbadania, należy kierować się zaleceniami zawartymi w rozdziale B.8 i B.29 niniejszego załącznika. W przypadku innych organów/tkanek (oraz w uzupełnieniu określonych utrwalonych tkanek z dróg oddechowych) należy zbadać organy zgodnie z listą określoną dla pokarmowej drogi podania.

▼M4

Histopatologia

38. Dostępne są wytyczne dotyczące najlepszych praktyk związanych z przeprowadzaniem toksykologicznych badań zmian patologicznych (33). Należy zbadać co najmniej następujące tkanki:

— wszystkie tkanki zwierząt z grup otrzymujących wysokie dawki i z grup kontrolnych,

— wszystkie tkanki zwierząt w stanie agonalnym lub uśmierconych podczas badania,

— wszystkie tkanki wykazujące makroskopowe nieprawidłowości, w tym guzy,

— w przypadku zaobserwowania w grupie otrzymującej wysoką dawkę histopatologicznych zmian związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej należy zbadać takie same tkanki pochodzące od wszystkich zwierząt ze wszystkich pozostałych grup otrzymujących dawki,

— w przypadku organów parzyastych, np. nerek lub nadnerczy, należy zbadać obydwa organy.

DANE ORAZ SPORZĄDZENIE SPRAWOZDANIA

Dane

39. Należy przedstawić dane dotyczące każdego zwierzęcia, w odniesieniu do wszystkich poddawanych oszacowaniu parametrów. Dodatkowo wszystkie dane należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które zginęły w trakcie trwania badania lub które uśmiercono z przyczyn humanitarnych, wraz z określeniem czasu, w którym nastąpiła śmierć lub humanitarne uśmiercenie, liczbę zwierząt wykazujących objawy toksyczności, opis obserwowanych objawów toksyczności, w tym czas ich pojawienia się, czas trwania, stopień ostrości wszelkich skutków toksycznych, liczbę zwierząt wykazujących zmiany, typ takich zmian oraz procent zwierząt wykazujących każdy typ zmiany. W tabelach z zestawieniem danych, oprócz klasyfikacji zmian, należy przedstawić średnie i odchylenia standardowe (dla danych z badań ciągłych) dotyczące zwierząt wykazujących skutki toksyczne lub zmiany.

40. Historyczne dane kontrolne mogą być cenne przy interpretacji wyników badania, np. jeśli istnieją przesłanki, że dane uzyskane z jednoczesnych kontroli są w sposób znaczący niestandardowe w porównaniu z najnowszymi danymi dotyczącymi zwierząt kontrolnych z tego samego obiektu/badanej kolonii. Historyczne dane kontrolne, jeśli poddaje się je oszacowaniu, powinny przedstawić to samo laboratorium i powinny się odnosić do zwierząt w tym samym wieku i z tego samego szczepu, oraz powinny zostać wygenerowane w ciągu pięciu lat przed rozpoczęciem rozważanego badania.

41. W stosownych przypadkach wyniki liczbowe należy poddawać oszacowaniu za pomocą właściwych i ogólnie przyjętych metod statystycznych. Metody statystyczne i dane poddawane analizie należy wybrać w czasie przygotowywania projektu badania (pkt 9). Taki wybór powinien uwzględniać, w razie potrzeby, korektę uwzględniającą zwierzęta, które przeżyły.

Sprawozdanie z badania

42. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— cechy fizyczne, czystość i własności fizykochemiczne,

— dane dotyczące tożsamości,

▼M4

— źródło substancji chemicznej,

— numer partii,

— świadectwo analizy chemicznej.

Nośnik (w stosownych przypadkach)

— uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda).

Badane zwierzęta

— wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie takiego wyboru,

— liczba, wiek i płeć zwierząt na początku badaniu,

— źródło, warunki przebywania, pokarm itp.,

— masa ciała poszczególnych zwierząt na początku badania.

Warunki badania

— uzasadnienie drogi podania i doboru dawek,

— w stosownych przypadkach metody statystyczne zastosowane do analizy danych,

— szczegółowe informacje na temat postaci użytkowej substancji badanej/przygotowywania pokarmu,

— dane analityczne dotyczące osiąganego stężenia, stabilności i jednorodności preparatu,

— droga podania i szczegółowe dane dotyczące podawania substancji badanej,

— w przypadku badań z inhalacyjną drogą podania informacje o tym, czy podanie odbywa się wyłącznie przez nos, czy przez całe ciało,

— dawki rzeczywiste (mg/kg masy ciała/dzień), wskaźnik konwersji stężenia substancji badanej w pokarmie/wodzie pitnej (mg/kg lub ppm) do dawki rzeczywistej, jeśli ma to zastosowanie,

— szczegółowe informacje na temat jakości pokarmu i wody.

Wyniki (należy przedstawić zestawienie danych w tabeli oraz dane dotyczące poszczególnych zwierząt)

Wymogi ogólne

— dane dotyczące zwierząt, które przeżyły,

— masa ciała/zmiany masy ciała,

— dane dotyczące spożycia pokarmu, wyliczenia wydajności pokarmu, jeśli przeprowadzono, oraz dane dotyczące spożycia wody, w stosownych przypadkach,

— dane toksykokinetyczne, jeśli dostępne,

— oftalmoskopia (jeśli takie dane są dostępne),

— hematologia (jeśli takie dane są dostępne),

— biochemia kliniczna (jeśli takie dane są dostępne).

▼M4

Ustalenia badań klinicznych

— objawy toksyczności,

— występowanie (i ostrość, jeśli poddano ją ocenie) wszelkich nieprawidłowości,

— rodzaj, ostrość i czas trwania obserwowanych objawów klinicznych (tak odwracalnych, jak i nieodwracalnych).

Dane dotyczące sekcji zwłok

— masa ciała w chwili zgonu,

— masa organów i ich współczynniki, jeśli takie dane są dostępne,

— ustalenia z sekcji zwłok; występowanie i stopień ostrości nieprawidłowości.

Histopatologia

— ustalenia histopatologiczne inne niż dotyczące nowotworów,

— ustalenia histopatologiczne dotyczące nowotworów,

— korelacja między objawami makroskopowymi i mikroskopowymi,

— szczegółowy opis wszystkich ustaleń histopatologicznych związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej, w tym klasyfikacja ostrości skutków,

— sprawozdanie z ewentualnej wzajemnej oceny preparatów.

W stosownych przypadkach, statystyczne opracowanie wyników

Omówienie wyników, w tym:

— omówienie wszelkich podejść modelowych,

— zależność dawka-odpowiedź,

— historyczne dane kontrolne,

— rozważenie wszelkich informacji na temat sposobu działania,

— określenie BMD, NOAEL lub LOAEL,

— znaczenie dla ludzi.

Wnioski

BIBLIOGRAFIA:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rzym, 1995), wewnętrzny dokument roboczy, Dyrekcja ds. Środowiska, OECD, Paryż.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency, Waszyngton, D.C.

(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 i in. (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) Rozdział B.27 niniejszego załącznika. Badanie toksyczności podprzewlekłej drogą pokarmową – badania toksyczności drogą pokarmową na gatunkach innych niż gryzonie metodą powtarzanej 90-dniowej dawki.

(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, dostępne na publicznej stronie OECD poświęconej wytycznych dotyczących badań, www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment nr 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paryż.

(9) Rozdział B.8 niniejszego załącznika. Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (inhalacyjna).

(10) Rozdział B.29 niniejszego załącznika. Badanie podprzewlekłej toksyczności inhalacyjnej – 90-dniowe badania inhalacyjne z wykorzystaniem gatunków gryzoni.

(11) Rozdział B.9 niniejszego załącznika. Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (dermalna).

(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. Toxicol, 36: 793–801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, i 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 i in. (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 i in. (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 i in. (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 i in. (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 nr 35 oraz Series on Pesticides nr 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paryż.

(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 nr 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paryż.

▼**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 (Międzynarodowy Instytut Nauk Biologicznych) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (red.). ILSI Press, Waszyngton, D.C.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN i 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 i Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. W: D'Arcy POF & Harron DWG (red.). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. s. 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) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication nr 86-23. Waszyngton D.C., Departament Zdrowia i Opieki Społecznej Stanów Zjednoczonych.

(29) GV-SOLAS (Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, 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 (Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, 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, i in. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198–201.

(33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P i in. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICJA

Substancja badana: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M4

B.33. ŁĄCZONE BADANIA TOKSYCZNOŚCI PRZEWLEKŁEJ/RAKOTWÓRCZOŚCI

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 453 (2009). Pierwotny tekst TG 453 przyjęto w 1981 r. Opracowanie niniejszej zmienionej metody badawczej B.33 uznano za konieczne w celu odzwierciedlenia ostatnich zmian w dziedzinie dobrostanu zwierząt i wymogów regulacyjnych (1) (2) (3) (4) (5). Aktualizację niniejszej metody badawczej B.33 przeprowadzono równolegle z modyfikacjami rozdziału B.32 niniejszego załącznika, dotyczącego badań rakotwórczości, oraz rozdziału B.30 niniejszego załącznika, dotyczącego badań toksyczności przewlekłej, w celu uzyskania dodatkowych informacji na podstawie zwierząt wykorzystanych w badaniu oraz w celu zapewnienia dalszych szczegółowych informacji na temat doboru dawek. Niniejszą metodę badawczą opracowano w celu jej wykorzystywania w badaniach szerokiego zakresu chemikaliów, w tym pestycydów i chemikaliów przemysłowych. Należy zauważyć jednak, że niektóre dane szczegółowe i wymogi mogą różnić się w przypadku produktów farmaceutycznych [zob. wytyczne S1B dotyczące badania produktów farmaceutycznych pod kątem rakotwórczości Międzynarodowej Konferencji ds. Harmonizacji (ICH)].

2. Większość badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości przeprowadza się z wykorzystaniem gatunków gryzoni, w związku z czym niniejsza metoda badawcza przewidziana jest do stosowania przede wszystkim w badaniach z wykorzystaniem takich gatunków. W przypadku konieczności przeprowadzenia takich badań z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie także można zastosować zasady i procedury określone w niniejszej metodzie badawczej, przy wprowadzeniu odpowiednich modyfikacji, wraz z zasadami i procedurami określonymi w rozdziale B.27 niniejszego załącznika, dotyczącym 90-dniowego badania toksyczności pokarmowej wywołanej powtarzanym dawkowaniem z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie (6), zgodnie z wytycznymi OECD nr 116 dotyczącymi opracowywania i przeprowadzania badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (7).

3. Trzy główne drogi podania stosowane w badaniach toksyczności przewlekłej/rakotwórczości to droga pokarmowa, dermalna i inhalacyjna. Wybór drogi podania zależy od fizycznych i chemicznych właściwości substancji badanej oraz głównej drogi narażenia ludzi. Dodatkowe informacje na temat wyboru drogi narażenia przedstawiono w wytycznych nr 116 (7).

4. W ramach niniejszej metody badawczej kładzie się nacisk na narażenie drogą pokarmową, która jest drogą najczęściej stosowaną w badaniach toksyczności przewlekłej i rakotwórczości. Przeprowadzenie długoterminowych badań obejmujących narażenie drogą dermalną lub inhalacyjną może być również konieczne do oceny ryzyka dla zdrowia ludzi lub wymagane w ramach pewnych systemów regulacji, obydwie te drogi narażenia wymagają jednak badań znacznie złożonych technicznie. Takie badania będą musiały zostać opracowane dla poszczególnych przypadków, jednak opisana w niniejszym rozdziale metoda badawcza mająca na celu ocenę i oszacowanie toksyczności przewlekłej i rakotwórczości przy pokarmowej drodze podania może stanowić podstawę dla protokołu badania z zastosowaniem inhalacyjnej lub dermalnej drogi podania, z zastrzeżeniem zaleceń dotyczących okresów poddawania działaniu substancji, parametrów klinicznych, parametrów analizy patologicznej itp. Dostępne są wytyczne OECD dotyczące podawania substancji badanych drogą inhalacyjną (7) (8) i drogą dermalną (7). Podczas opracowywania badań uwzględniających dłuższy okres narażenia drogą inhalacyjną należy w szczególności wziąć pod uwagę rozdział B.8 niniejszego załącznika (9) oraz rozdział B.29 niniejszego załącznika (10), a także wytyczne OECD dotyczące badania ostrej toksyczności inhalacyjnej (8). W przypadku badań przeprowadzanych drogą dermalną należy uwzględnić rozdział B.9 niniejszego załącznika (11).

▼M4

5. Łączone badanie toksyczności przewlekłej/rakotwórczości dostarcza informacji na temat potencjalnych zagrożeń dla zdrowia, których pojawienie się jest prawdopodobne w przypadku narażenia powtarzającego się przez okres trwający nawet przez całą długość życia wykorzystanego w badaniu gatunku. Badanie dostarczy informacji na temat skutków toksycznych substancji badanej, w tym na temat potencjalnej rakotwórczości, wskaże organy docelowe i możliwość akumulacji. Badanie może także dostarczyć szacunkowych informacji na temat poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian w kontekście skutków toksycznych oraz, w przypadku niegenotoksycznych substancji rakotwórczych, w odniesieniu do reakcji guzów, które to informacje można wykorzystać do ustalenia kryteriów bezpieczeństwa dla narażenia ludzi. Podkreśla się również konieczność uważnych obserwacji klinicznych zwierząt, aby uzyskać możliwie jak najwięcej informacji.

6. Cele badań toksyczności przewlekłej/rakotwórczości w ramach niniejszej metody badawczej obejmują:

— określenie właściwości rakotwórczych substancji badanej, skutkujących zwiększonym występowaniem nowotworów, zwiększonym odsetkiem nowotworów złośliwych lub szybszym wystąpieniem nowotworów, w porównaniu z równoległymi grupami kontrolnymi,

— określenie czasu, po którego upływie pojawiają się nowotwory,

— określenie toksyczności przewlekłej substancji badanej,

— określenie organu lub organów docelowych toksyczności przewlekłej i rakotwórczości,

— scharakteryzowanie zależności dawka-odpowiedź,

— określenie poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL) lub punktu wyjścia dla ustalenia dawki wyznaczającej (BMD),

— ekstrapolacja skutków rakotwórczych do poziomów narażenia ludzi przy niskich dawkach,

— oszacowanie skutków toksyczności przewlekłej do poziomów narażenia ludzi,

— pozyskanie danych do zbadania hipotez dotyczących sposobu działania (2) (7) (12) (13) (14) (15).

WSTĘPNE ROZWAŻANIA

7. Podczas oceny i oszacowania potencjalnej rakotwórczości i toksyczności przewlekłej substancji badanej laboratorium badawcze powinno rozważyć wszystkie dostępne informacje na temat substancji badanej przed rozpoczęciem badania, w celu opracowania takiego projektu badania, który umożliwi zbadanie toksykologicznych właściwości w sposób bardziej efektywny oraz zminimalizuje wykorzystanie zwierząt. Szczególnie istotne są informacje na temat sposobu działania substancji, co do której podejrzewa się, że jest substancją rakotwórczą, oraz uwzględnienie takiego sposobu działania (2) (7) (12) (13) (14) (15), ponieważ optymalny projekt badania może różnić się w zależności od tego, czy substancja badana jest znaną genotoksyczną substancją rakotwórczą czy też substancją, co do której podejrzewa się działanie genotoksyczne i rakotwórcze. Dalsze wytyczne na temat kwestii dotyczących sposobu działania można znaleźć w wytycznych nr 116 (7).

8. Informacje, które będą pomocne w opracowywaniu projektu badania obejmują tożsamość, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne substancji badanej; wszelkie informacje na temat sposobu działania; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*, w tym badań genotoksyczności; spodziewane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR, mutagenności/genotoksyczności, rakotwórczości oraz inne dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie powiązanych związków; dostępne dane toksykokinetyczne (jeśli dostępne, dane dotyczące kinetyki jednorazowego podania i podania powtórzonego) oraz

▼M4

dane pochodzące z innych badań narażenia powtarzanego. Ocenę toksyczności przewlekłej/rakotwórczości należy przeprowadzić wyłącznie po uzyskaniu wstępnych informacji na temat toksyczności na podstawie 28-dniowych lub 90-dniowych badań toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem. Użytecznych informacji mogą dostarczyć także krótkoterminowe badania dotyczące inicjacji i promocji w kontekście rakotwórczości. W kontekście badania rakotwórczości należy rozważyć podejście oparte na etapach, w ramach ogólnej oceny potencjalnych niepożądanych skutków dla zdrowia wywoływanych przez daną substancję badaną (16) (17) (18) (19).

9. Metody statystyczne najbardziej odpowiednie do analizy wyników, przy uwzględnieniu projektu doświadczenia i celów badania, należy ustalić przed rozpoczęciem badania. Wśród kwestii, jakie należy rozważyć, znajduje się pytanie, czy dane statystyczne powinny zawierać korektę uwzględniającą zwierzęta, które przeżyły, analizę łącznego ryzyka wystąpienia guza w odniesieniu do okresu przeżycia, analizę tego, jak szybko wystąpił guz, oraz analizę w przypadku przedwczesnego uśmiercenia jednej grupy lub większej liczby grup. Wytyczne dotyczące odpowiednich analiz statystycznych i kluczowych odniesień do uznanych na świecie metod statystycznych zawarto w wytycznych nr 116 (7), a także wytycznych nr 35 dotyczących analizy i ewaluacji badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (20).

10. Podczas przeprowadzania badania rakotwórczości należy w każdym przypadku kierować się głównymi zasadami i rozważaniami przedstawionymi w wytycznych OECD dotyczących rozpoznawania, oceny i stosowania objawów klinicznych jako humanitarnego punktu końcowego w odniesieniu do zwierząt wykorzystanych w badaniu oceny bezpieczeństwa (21), a zwłaszcza w wytycznych zawartych w pkt 62 tego dokumentu. Punkt ten stanowi, że: „*W badaniach z zastosowaniem powtarzanego dawkowania, jeśli zwierzę wykazuje objawy kliniczne, które postępują, prowadząc do dalszego pogorszenia jego stanu, należy podjąć uzasadnioną decyzję na temat tego, czy w sposób humanitarny uśmiercić takie zwierzę. Taka decyzja powinna opierać się na rozważeniu wartości informacji, jakie można uzyskać dzięki dalszemu utrzymywaniu takiego zwierzęcia w ramach badania i uwzględniać ogólny stan takiego zwierzęcia. Jeśli zapadnie decyzja o pozostawieniu takiego zwierzęcia w badaniu, częstotliwość obserwacji należy w razie potrzeby zwiększyć. Można także tymczasowo zaprzestać dawkowania, jeśli nie wpłynie to w sposób niekorzystny na cel badania, a zmniejszy cierpienie lub stres odczuwany przez zwierzę, lub też można zmniejszyć podawaną dawkę*”.

11. Szczegółowe wytyczne dotyczące zasad doboru dawek w przypadku badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości, a także omówienie takich zasad, można znaleźć w wytycznych nr 116 (7), oraz w publikacjach Międzynarodowego Instytutu Nauk Biologicznych (ILSI) (22) (23). Główna strategia doboru dawek zależy od głównego celu lub celów badania (pkt 6). Podczas doboru odpowiednich poziomów dawek należy zachować równowagę między kontrolą zagrożenia a określeniem reakcji na niskie dawki i ich istotnością. Ma to szczególne znaczenie w przypadku łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości.

12. Należy rozważyć przeprowadzenie niniejszego łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości zamiast przeprowadzania osobno badania toksyczności przewlekłej (rozdział B.30 niniejszego załącznika) i badania rakotwórczości (rozdział B.32 niniejszego załącznika). W porównaniu z przeprowadzaniem dwóch osobnych badań łączone badanie zapewnia większą efektywność pod względem czasu i kosztów, a jednocześnie nie obniża jakości danych, czy to na etapie badania toksyczności przewlekłej, czy też na etapie badania rakotwórczości. Przy przeprowadzaniu łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości należy jednak zwrócić szczególną uwagę na zasady doboru dawek (pkt 11 i 22–26), a także uznaje się, że w przypadku pewnych ram regulacyjnych wymagane może być przeprowadzenie takich badań osobno. Dalsze wytyczne dotyczące projektu łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości umożliwiającego osiągnięcie maksymalnej efektywności badania pod względem ograniczenia liczby wykorzystanych zwierząt, a także poprzez usprawnienie różnych procedur doświadczalnych, można znaleźć w wytycznych nr 116 (7).

▼M4

13. Definicje stosowane w kontekście niniejszej metody badawczej można znaleźć na końcu tego rozdziału oraz w wytycznych nr 116 (7).

ZASADA BADANIA

14. Układ badania obejmuje dwa równoległe etapy – etap badania toksyczności przewlekłej i etap badania rakotwórczości (w celu uzyskania informacji na temat czasu trwania etapów zob. odpowiednio pkt 34 i 35). Substancję badaną podaje się zazwyczaj drogą pokarmową, choć w niektórych przypadkach właściwe może być badanie z zastosowaniem drogi inhalacyjnej lub dermalnej. Na etapie badania toksyczności przewlekłej substancję badaną podaje się codziennie w dawkach stopniowanych kilku grupom badanych zwierząt, przy czym każda grupa otrzymuje inny poziom dawki, zazwyczaj przez okres 12 miesięcy, choć w zależności od wymogów regulacyjnych można wybrać także dłuższy lub krótszy czas trwania tego etapu badania (zob. pkt 34). Czas trwania wybiera się w taki sposób, by badanie było dostatecznie długie, aby umożliwić widoczne pojawienie się wszelkich skumulowanych skutków toksyczności, jednocześnie unikając mogących wprowadzić w błąd skutków zmian wynikających z wieku. Układ badania może obejmować także uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia, np. po upływie 3 i 6 miesięcy, a także dodatkowe grupy zwierząt w celu umożliwienia takiego działania (zob. pkt 20). Na etapie badania rakotwórczości substancję badaną podaje się codziennie kilku grupom badanych zwierząt, przez większą część długości ich życia. Podczas obydwu etapów zwierzęta obserwuje się uważnie w celu wykrycia objawów toksyczności i pojawienia się zmian nowotworowych. Zwierzęta, które zginą lub zostaną uśmiercone podczas badania, są poddawane sekcji zwłok, a zwierzęta, które przeżyją, są, po zakończeniu badania, uśmiercane i poddawane sekcji zwłok.

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

15. Niniejsza metoda badawcza obejmuje przede wszystkim ocenę i oszacowanie toksyczności przewlekłej i rakotwórczości u gryzoni (pkt 2). Wykorzystanie gatunków innych niż gryzonie można rozważyć, jeśli dostępne dane wskazują, że takie gatunki są bardziej odpowiednie w kontekście określenia skutków dla zdrowia u ludzi. Wybór gatunku należy uzasadnić. Preferowanym gatunkiem gryzoni jest szczur, można jednak wykorzystać także inne gatunki, np. mysz. Choć w przeszłości wykorzystanie myszy w badaniach rakotwórczości mogło ograniczać użyteczność takich badań (24) (25) (26), w ramach niektórych obowiązujących przepisów nadal wymaga się badania rakotwórczości z wykorzystaniem myszy, o ile nie ustalono, że takie badanie nie jest konieczne z naukowego punktu widzenia. Szczury i myszy są jak dotąd preferowanymi modelami doświadczalnymi z uwagi na ich względnie krótką długość życia, powszechne wykorzystywanie w badaniach farmakologicznych i toksykologicznych, podatność na powstawanie guzów, a także dostępność dostatecznie scharakteryzowanych szczepów. Z racji tych cech dostępne są znaczne ilości informacji na temat ich fizjologii i patologii. Projekt i przeprowadzenie badań toksyczności przewlekłej/rakotwórczości z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie, jeśli jest to wymagane, powinny opierać się na zasadach określonych w niniejszej metodzie badawczej, a także na zasadach określonych w rozdziale B.27 niniejszego załącznika, dotyczącym 90-dniowego badania toksyczności pokarmowej wywołanej powtarzanym dawkowaniem z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie (6). Dodatkowe informacje dotyczące wyboru gatunku i szczepu przedstawiono w wytycznych nr 116 (7).

16. Zaleca się wykorzystanie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt pochodzących ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach. Badanie toksyczności przewlekłej/rakotwórczości należy przeprowadzić z wykorzystaniem zwierząt z tego samego szczepu i źródła, z którego pochodziły zwierzęta wykorzystane we wstępnym badaniu lub wstępnych badaniach toksyczności o krótszym czasie trwania, niemniej jednak, jeśli wiadomo, że w przypadku zwierząt z danego szczepu i źródła pojawiają się problemy z osiągnięciem powszechnie przyjętego kryterium przeżycia w badaniach długoterminowych [zob. wytyczne nr 116 (7)], należy rozważyć wykorzystanie szczepu zwierząt, który charakteryzuje się akceptowalnym wskaźnikiem przeżycia w przypadku badań długoterminowych. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży.

▼M4

Warunki przetrzymywania i karmienia

17. Zwierzęta można przetrzymywać pojedynczo lub też w klatkach w małych grupach składających się z osobników tej samej płci; przetrzymywanie zwierząt pojedynczo należy rozważyć, wyłącznie jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia (27) (28) (29). Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Temperatura w pomieszczeniach badawczych, w których przetrzymuje się zwierzęta, powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, by poza czasem czyszczenia pomieszczenia nie przekraczała 70 %, należy dążyć do utrzymania jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Pasza powinna spełniać wszystkie wymogi związane z odżywianiem badanych gatunków, a obecna w niej zawartość pokarmowych substancji zanieczyszczających, w tym między innymi pozostałości pestycydów, trwałych zanieczyszczeń organicznych, fitoestrogenów, metali ciężkich i mikotoksyn, które mogą wpłynąć na wynik badania, powinna być możliwie jak najniższa. Okresowo należy generować informacje analityczne na temat poziomów składników odżywczych i pokarmowych substancji zanieczyszczających, a przynajmniej na początku badania oraz w przypadku zmiany stosowanej partii. Takie informacje należy uwzględnić w sprawozdaniu końcowym. Informacje analityczne na temat wody pitnej stosowanej w badaniu należy przedstawić w podobny sposób. Na wybór pokarmu może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej mieszaniny substancji badanej, a także potrzeba spełnienia wymogów związanych z odżywianiem zwierząt, jeśli substancję badaną podaje się wraz z pokarmem.

Przygotowanie zwierząt

18. Należy wykorzystać zdrowe zwierzęta aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez okres co najmniej 7 dni oraz niepoddawane wcześniej procedurom badawczym. W przypadku gryzoni dawkowanie substancji zwierzętom należy rozpocząć możliwie jak najszybciej po odsadzeniu i aklimatyzacji oraz najlepiej, zanim zwierzęta osiągną wiek 8 tygodni. Badane zwierzęta należy scharakteryzować ze względu na ich gatunek, szczep, źródło, płeć, wagę i wiek. W chwili rozpoczęcia badania odchylenia masy dla obu płci wykorzystanych zwierząt powinny być minimalne i nie przekraczać ± 20 % średniej masy wszystkich zwierząt wykorzystanych w ramach badania, osobno dla każdej płci. Należy losowo przydzielić zwierzęta do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu substancji badanej. Po randomizacji między grupami nie powinno być znaczących różnic w średniej wadze osobników, w odniesieniu do obu płci. Jeśli odnotowano statystycznie istotne różnice, randomizację należy powtórzyć, jeśli jest to możliwe. Każdemu zwierzęciu należy przydzielić niepowtarzalny numer identyfikacyjny i w sposób stały oznaczyć je tym numerem poprzez jego wytatuowanie, wszczepienie implantu z chipem lub za pomocą innej odpowiedniej metody.

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

19. Należy wykorzystać zwierzęta obu płci. Należy wykorzystać wystarczającą liczbę zwierząt, aby umożliwić szczegółowe szacunki z punktu widzenia biologicznego i statystycznego. W związku z powyższym w przypadku gryzoni każda grupa otrzymująca dawki (jak określono to w pkt 22) oraz równoległa grupa kontrolna przeznaczone do etapu badania rakotwórczości powinny liczyć co najmniej 50 zwierząt każdej płci. W zależności od celu badania można zwiększyć moc statystyczną kluczowych szacunków poprzez zróżnicowane przydzielenie zwierząt nierównomiernie do grup otrzymujących różne dawki, przy czym w grupach otrzymujących niskie dawki powinno być więcej niż 50 zwierząt; np. w celu oszacowania rakotwórczości przy niskich dawkach. Należy jednak pamiętać, że umiarkowane zwiększenie liczebności grupy oznacza względnie niewielkie zwiększenie mocy statystycznej badania. W przypadku gryzoni każda grupa otrzymująca

▼M4

dawki (jak określono to w pkt 22) oraz równoległa grupa kontrolna przeznaczone do etapu badania toksyczności przewlekłej powinny liczyć co najmniej 10 zwierząt każdej płci. Należy zauważyć, że liczba ta jest niższa niż liczba określona dla badania toksyczności przewlekłej (rozdział B.30 niniejszego załącznika). Przy interpretacji danych pochodzących od zmniejszonej liczby zwierząt w grupie na etapie badania toksyczności przewlekłej w ramach takiego łączonego badania można jednak posłużyć się danymi pochodzącymi od większej liczby zwierząt przewidzianych w ramach etapu badania rakotwórczości. W przypadku badań z wykorzystaniem myszy na etapie badania toksyczności przewlekłej może zaistnieć konieczność dodania zwierząt do każdej z grup otrzymujących dawki, w celu przeprowadzenia wszystkich wymaganych oznaczeń hematologicznych. Więcej informacji na temat projektu badania pod względem statystycznym oraz doboru poziomów dawek w celu zmaksymalizowania mocy statystycznej zawarto w wytycznych nr 116 (7).

Ustalenia dotyczące uśmiercania w trakcie trwania doświadczenia oraz grup satelitarnych (wskaźnikowych)

20. W ramach badania można założyć uśmiercanie zwierząt w trakcie trwania doświadczenia, np. po upływie 6 miesięcy w przypadku etapu badania toksyczności przewlekłej, w celu uzyskania informacji na temat progresji zmian innych niż nowotworowe oraz informacji dotyczących mechanizmu działania, jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia. Jeśli takie informacje są już dostępne dzięki poprzednim badaniom toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem substancji badanej, uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia może nie być uzasadnione z naukowego-punktu widzenia. Zwierzęta wykorzystane na etapie badania toksyczności przewlekłej, który trwa zazwyczaj 12 miesięcy (pkt 34), dostarczają danych dotyczących uśmiercania w trakcie trwania doświadczenia przydatnych w kontekście etapu badania rakotwórczości, dzięki czemu ogranicza się całkowitą liczbę wykorzystanych zwierząt. Na etapie badania toksyczności przewlekłej można uwzględnić także grupy satelitarne, w celu monitorowania odwracalności zmian toksykologicznych wywołanych substancją badaną. Wprowadzenie takich grup można ograniczyć do najwyższego poziomu dawki stosowanego w badaniu oraz grupy kontrolnej. W celu monitorowania w trakcie badania, w razie konieczności, statusu choroby, można uwzględnić dodatkową grupę zwierząt wskaźnikowych (zazwyczaj 5 zwierząt każdej płci) (30). Dalsze wytyczne dotyczące projektu badania uwzględniającego uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia, zwierzęta satelitarne i wskaźnikowe w celu zminimalizowania całkowitej liczby wykorzystanych zwierząt przedstawiono w wytycznych nr 116 (7).

21. Jeśli projekt badania przewiduje wykorzystanie zwierząt satelitarnych lub uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia, liczba zwierząt w każdej grupie otrzymującej dawki przewidziana w tym celu będzie wynosić zazwyczaj 10 zwierząt każdej płci, zaś całkowitą liczbę zwierząt przewidzianych w układzie badania należy zwiększyć o liczbę zwierząt przeznaczonych do uśmiercenia przed zakończeniem badania. Zwierzęta przewidziane do uśmiercenia w trakcie trwania doświadczenia lub zwierzęta satelitarne zazwyczaj poddaje się takim samym obserwacjom, w tym obserwacjom dotyczącym masy ciała, spożycia pokarmu/wody, pomiarom hematologicznym i pod kątem biochemii klinicznej oraz pod kątem patologii, co zwierzęta wykorzystane w ramach głównego badania na etapie badania toksyczności przewlekłej, choć można założyć (w przypadku grup przewidzianych do uśmiercenia w trakcie trwania doświadczenia) ograniczenie takich pomiarów do konkretnych kluczowych działań, takich jak badanie neurotoksyczności lub immunotoksyczności.

Grupy otrzymujące dawki oraz dawkowanie

22. Wytyczne dotyczące wszystkich aspektów doboru dawek oraz zróżnicowania poziomu dawek zawarto w wytycznych nr 116 (7). Należy zastosować co najmniej trzy poziomy dawek oraz ustanowić równoległą grupę kontrolną, zarówno dla etapu badania toksyczności przewlekłej, jak i dla etapu badania rakotwórczości. Poziomy dawek będą zazwyczaj oparte na wynikach krótkoterminowych badań z powtarzanym dawkowaniem lub badań ustalających zakres dawkowania oraz należy uwzględnić w tym kontekście wszelkie istniejące dane toksykologiczne i toksykokinetyczne dostępne w odniesieniu do substancji badanej lub substancji powiązanych.

▼M4

23. W przypadku etapu badania toksyczności przewlekłej pełne badanie z zastosowaniem trzech poziomów dawek może zostać uznane za zbędne, jeśli możliwe jest założenie, że badanie z zastosowaniem jednego poziomu dawki, równego co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała dziennie, nie spowoduje szkodliwych skutków. Takie założenie powinno opierać się na informacjach pochodzących z badań wstępnych oraz określeniu, że na podstawie danych dotyczących innych strukturalnie powiązanych związków nie przewiduje się toksyczności. Można zastosować limit 1 000 mg/kg masy ciała dziennie, z wyjątkiem sytuacji, gdy narażenie ludzi wskazuje potrzebę zastosowania wyższego poziomu dawki.

24. O ile nie ogranicza tego fizykochemiczny charakter biologicznych skutków działania substancji badanej, należy wybrać najwyższy poziom dawki w celu określenia głównych organów docelowych oraz skutków toksycznych, jednocześnie unikając cierpienia, toksyczności ostrej, chorobowości lub śmierci. Należy wybrać najwyższy poziom dawki w celu uzyskania dowodów na toksyczność, potwierdzonych, na przykład, wolniejszym przybieraniem na wadze (o około 10 %). W zależności od celów badania (zob. pkt 6) można jednak wybrać górną dawkę niższą od dawki potwierdzającej toksyczność, np. jeśli dawka powoduje niekorzystny skutek istotny dla badania, który ma jednak niewielki wpływ na długość życia czy masę ciała.

25. Poziomy dawek i zróżnicowanie ich poziomów można dobrać tak, by określić odpowiedź zależną od dawki oraz, w zależności od sposobu działania substancji badanej, NOAEL lub inny pożądany wynik badania, np. BMD (zob. pkt 27). Przy stosowaniu niższych dawek należy rozważyć takie czynniki, jak spodziewane nachylenie krzywej dawka-odpowiedź, dawki, przy których mogą pojawić się istotne zmiany w metabolizmie, lub charakter działania toksycznego, przy którym oczekuje się wartości granicznej lub punktu wyjścia dla ekstrapolacji dla niskiej dawki. Przy przeprowadzaniu łączonego badania rakotwórczości/toksyczności przewlekłej głównym celem będzie uzyskanie informacji koniecznych do oceny ryzyka wystąpienia rakotwórczości, zaś informacje dotyczące toksyczności przewlekłej będą zazwyczaj stanowić cel drugorzędny. Należy o tym pamiętać przy doborze poziomów dawek oraz zróżnicowania poziomów dawek na potrzeby badania.

26. Wybrane zróżnicowanie poziomów dawki będzie zależeć od celów badania i właściwości substancji badanej i nie może zostać z góry szczegółowo określone w niniejszej metodzie badawczej, jednak zastosowanie dwóch do czterech odstępów pomiędzy kolejnym dawkowaniem często zapewnia dobre wyniki badania dla ustalenia malejących poziomów dawki, a dodanie czwartej grupy badanej jest często rozwiązaniem preferowanym w porównaniu ze stosowaniem bardzo dużych interwałów między dawkowaniem (np. współczynnik większy niż 6-10). Zasadniczo należy unikać stosowania współczynników większych niż 10, a w przypadku ich zastosowania należy je uzasadnić.

27. Jak omówiono to w wytycznych OECD nr 116 (7), kwestie, jakie należy rozważyć przy doborze dawki, obejmują:

— znane lub podejrzewane nieliniowości lub punkty przegięcia krzywej dawka-odpowiedź,

— toksykokinetykę oraz zakresy dawkowania, przy których występuje lub nie występuje indukcja metaboliczna, nasycenie lub też nieliniowość między zewnętrznymi a wewnętrznymi dawkami,

— zmiany prekursorowe, markery skutku, lub wskaźniki działania kluczowych podstawowych procesów biologicznych,

▼M4

— kluczowe (lub podejrzewane) aspekty sposobu działania, takie jak dawki, przy których zaczyna pojawiać się cytotoksyczność, zakłócone zostają poziomy hormonów, przestają działać mechanizmy homeostatyczne itp.,

— regiony krzywej dawka-odpowiedź, gdzie konieczne są szczególnie solidne szacunki, np. w zakresie spodziewanej BMD lub podejrzewanej wartości granicznej,

— spodziewane poziomy narażenia ludzi, zwłaszcza przy doborze dawek średnich i niskich.

28. Grupa kontrolna powinna być grupą niepoddawaną działaniu substancji badanej lub grupą kontrolną nośnika, jeśli do podawania substancji badanej zastosowano nośnik. Z wyjątkiem poddawania działaniu substancji badanej, zwierzęta z grupy kontrolnej należy traktować w sposób identyczny ze sposobem traktowania osobników z grup badanych. Jeśli zastosowano nośnik, grupa kontrolna otrzymuje nośnik w najwyższej objętości stosowanej wśród grup otrzymujących dawki. Jeśli substancję badaną podaje się wraz z pokarmem i jeśli powoduje ona znacznie zmniejszone pobranie pokarmu z powodu jego obniżonych wartości smakowych, pomocna może być dodatkowa grupa kontrolna zwierząt otrzymujących pokarm w ilości spożywanej przez zwierzęta z grupy badanej (pair-fed), która zapewni odpowiedniejszą kontrolę.

Przygotowanie dawek i podanie substancji badanej

29. Substancję badaną zazwyczaj podaje się drogą pokarmową, wraz z pokarmem lub wodą pitną, lub też za pomocą sondy. Dodatkowe informacje na temat dróg i metod podania przedstawiono w wytycznych nr 116 (7). Droga i metoda podania zależą od celu badania, fizykochemicznych właściwości substancji badanej, jej biodostępności oraz głównej drogi i metody narażenia ludzi. Należy przedstawić uzasadnienie wybranej drogi i metody podania. W trosce o dobrostan zwierząt należy w normalnych warunkach wybrać sondę żołądkową wyłącznie dla tych substancji, dla których taka droga i metoda podania w sposób uzasadniony odzwierciedlają potencjalne narażenie ludzi (np. produkty farmaceutyczne). Substancje występujące w pokarmie lub środowisku naturalnym, w tym pestycydy, podaje się zazwyczaj wraz z pokarmem lub wodą pitną. W przypadku jednak niektórych scenariuszy, np. narażenia zawodowego, podawanie substancji za pomocą innych dróg może być bardziej właściwe.

30. W razie potrzeby substancję badaną rozpuszcza się lub sporządza się jej zawiesinę w odpowiednim nośniku. W stosownych przypadkach należy wziąć pod uwagę następujące cechy nośnika i innych dodatków: wpływ na wchłanianie, dystrybucję, metabolizm oraz zatrzymywanie substancji badanej; wpływ na chemiczne własności substancji badanej, które mogą zmienić jej charakterystykę toksyczną; oraz wpływ na spożycie pokarmu lub wody, lub też na stan odżywienia zwierząt. Zaleca się, w miarę możliwości, najpierw rozważyć zastosowanie roztworu wodnego/zawiesiny, następnie roztworu/emulsji w oleju (np. z zastosowaniem oleju kukurydzianego), a potem możliwego roztworu w innych nośnikach. W przypadku nośników innych niż woda charakterystyka toksyczna nośnika powinna być znana. Dostępne powinny być także informacje na temat stabilności substancji badanej oraz jednorodności roztworów dawek lub pokarmu z dawkami (w zależności od sytuacji) w warunkach podawania (np. pokarm).

31. W przypadku substancji podawanych w pokarmie lub wodzie pitnej ważne jest dopilnowanie, by takie ilości substancji badanej nie zakłócały prawidłowej równowagi odżywiania lub spożycia wody. W przypadku długoterminowych badań toksyczności z zastosowaniem podawania dawek wraz z pokarmem stężenie substancji badanej w paszy nie powinno w normalnych warunkach przekraczać górnego limitu 5 % całego pokarmu, aby uniknąć zakłócenia równowagi odżywiania. Przy podawaniu substancji badanej wraz z pokarmem można zastosować stałe stężenie w pokarmie (mg/kg pokarmu lub ppm) lub też stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia (mg/kg masy ciała), obliczany cotygodniowo. Należy określić, które rozwiązanie zastosowano.

▼M4

32. Przy podawaniu substancji drogą pokarmową zwierzętom podaje się dawki substancji badanej codziennie (siedem dni w tygodniu), przez okres 12 miesięcy (etap badania toksyczności przewlekłej) lub 24 miesięcy (etap badania rakotwórczości), zob. także pkt 33 i 34. Zastosowanie innego systemu dawkowania, np. przez pięć dni w tygodniu, należy uzasadnić. Przy podawaniu substancji drogą dermalną zwierzęta zazwyczaj poddaje się działaniu substancji badanej przez co najmniej 6 godzin dziennie, 7 dni w tygodniu, zgodnie z rozdziałem B.9 niniejszego załącznika (11), przez okres 12 miesięcy (etap badania toksyczności przewlekłej) lub 24 miesięcy (etap badania rakotwórczości). Narażenie drogą inhalacyjną stosuje się przez 6 godzin dziennie, 7 dni w tygodniu, ale możliwe jest zastosowanie narażenia także przez 5 dni w tygodniu, jeśli zostanie to uzasadnione. Okres narażenia zazwyczaj wynosi 12 miesięcy (etap badania toksyczności przewlekłej) lub 24 miesiące (etap badania rakotwórczości). Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu wyłącznie poprzez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować tak, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. W przypadku stosowania okresu narażenia krótszego niż 6 godzin dziennie należy przedstawić stosowne uzasadnienie. Zob. również rozdział B.8 niniejszego załącznika (9).

33. Jeśli substancję badaną podaje się zwierzętom za pomocą sondy, należy dokonywać tego z użyciem sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej, każdego dnia o podobnych porach. Zazwyczaj podaje się pojedynczą dawkę raz dziennie, jeśli jednak substancja jest, na przykład, substancją wykazującą miejscowe działanie drażniące, możliwe jest zachowanie dziennej mocy dawki poprzez podawanie jej jako dawki dzielonej (dwa razy dziennie). Maksymalna objętość cieczy, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość taka powinna być możliwie jak najniższa i nie powinna w normalnych warunkach przekraczać 1 ml/100 g masy ciała w przypadku gryzoni (31). Zmienność stosowanej objętości należy zminimalizować poprzez dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość przy wszystkich poziomach dawek. Wyjątkiem są substancję potencjalnie żrące lub wykazujące działanie drażniące, które należy rozcieńczyć w celu uniknięcia miejscowych ostrych skutków. Należy unikać badania z użyciem stężeń, które mogą być żrące lub wykazywać działanie drażniące dla przewodu pokarmowego.

Czas trwania badania

34. Okres dawkowania i czas trwania etapu badania toksyczności przewlekłej w ramach badania łączonego wynoszą zazwyczaj 12 miesięcy, choć w ramach projektu badania można zaplanować i zastosować krótszy (wynoszący np. 6 lub 9 miesięcy) lub dłuższy (wynoszący np. 18 lub 24 miesiące) czas trwania badania, w zależności od wymogów poszczególnych systemów regulacyjnych lub w przypadku specyficznych celów związanych z mechanizmami. Odstępstwa od 12-miesięcznego czasu trwania narażenia należy uzasadnić, zwłaszcza w przypadku krótszych okresów. Badanie na wszystkich grupach otrzymujących dawki przydzielonych do tego etapu zostanie zakończone w wyznaczonym czasie w celu oceny toksyczności przewlekłej oraz zmian patologicznych innych niż nowotworowe. Grupy satelitarne wprowadzone w celu monitorowania odwracalności zmian toksykologicznych wywołanych przez substancję badaną należy utrzymać bez dawkowania przez okres nie krótszy niż 4 tygodnie oraz nie dłuższy niż jedna trzecia całego okresu trwania badania po ustaniu narażenia.

35. W przypadku gryzoni czas trwania etapu badania rakotwórczości w ramach badania łączonego będzie zazwyczaj wynosił 24 miesiące, co stanowi większą część standardowej długości życia zwierząt, które mają zostać wykorzystane w takim badaniu. Można ustalić dłuższy lub krótszy czas trwania badania w zależności od długości życia szczepu gatunku zwierząt wykorzystanego w badaniu, taką decyzję należy jednak uzasadnić. W przypadku pewnych szczepów myszy, np. szczepów AKR/J, C3H/J lub C57BL/6J, właściwszy może być czas trwania badania wynoszący 18 miesięcy. Poniżej znajdują się pewne wytyczne dotyczące czasu trwania badania, zakończenia badania oraz przeżycia; dalsze wytyczne, w tym rozważenia dotyczące dopuszczalności rakotwórczości ujemnie związanej z przeżyciem, przedstawiono w wytycznych nr 116 (7):

▼M4

— zakończenie badania należy rozważyć, jeśli liczba osobników, które pozostały przy życiu w grupach otrzymujących niższe dawki lub grupie kontrolnej, spadnie poniżej 25 %,

— jeśli wyłącznie osobniki z grupy otrzymującej wysokie dawki padną przedwcześnie z powodu toksyczności, nie powinno to powodować zakończenia badania,

— przeżycie osobników obu płci należy rozważyć osobno,

— nie należy przedłużać badania, jeśli dane dostępne dzięki badaniu stały się niewystarczające, aby umożliwić oszacowanie wiarygodne pod względem statystycznym.

OBSERWACJE (ETAP BADANIA TOKSYCZNOŚCI PRZEWLEKŁEJ)

36. Wszystkie zwierzęta należy sprawdzić pod kątem chorobowości i upadkowości, zazwyczaj na początku i pod koniec każdego dnia, włącznie z weekendami i dniami wolnymi od pracy. Ogólnych obserwacji klinicznych należy dokonywać co najmniej raz dziennie, najlepiej o tej samej porze lub porach każdego dnia, uwzględniając szczytowy okres przewidywanych skutków po podaniu dawki w przypadku podawania substancji badanej za pomocą sondy.

37. Przynajmniej raz przed pierwszym narażeniem należy dokonać szczegółowej obserwacji klinicznej wszystkich zwierząt (w celu umożliwienia porównań dotyczących tych samych osobników), a także pod koniec pierwszego tygodnia badania, a po tym okresie – co miesiąc. Protokół dotyczący obserwacji należy opracować tak, by zminimalizować odchylenia między poszczególnymi obserwatorami i by były one niezależne od badanej grupy. Obserwacji należy dokonywać poza klatką zwierzęcia, najlepiej w warunkach standardowych i za każdym razem o podobnych porach. Obserwacje należy starannie odnotować, najlepiej za pomocą systemów punktacji wyraźnie określonych przez laboratorium badawcze. Należy dołożyć starań w celu dopilnowania, aby odchylenia w warunkach obserwacji były minimalne. Odnotowane objawy powinny obejmować, między innymi, zmiany w skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin i wydalin oraz aktywność autonomicznego układu nerwowego (np. łzawienie, piloerekcję, rozmiar źrenicy, niestandardowe zmiany w sposobie oddychania). Należy odnotować także zmiany w sposobie chodzenia, postawie i reakcji na dotyk, jak również obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, zachowań stereotypowych (np. nadmierne czyszczenie się, powtarzające się krążenie w kółko) oraz dziwne zachowania (np. samookaleczanie się, chodzenie do tyłu) (32).

38. Badanie oftalmologiczne, za pomocą oftalmoskopu lub innego odpowiedniego sprzętu, należy przeprowadzić u wszystkich zwierząt przed pierwszym podaniem substancji badanej. Badanie to należy przeprowadzić także wraz z zakończeniem badania, najlepiej u wszystkich zwierząt, a co najmniej w grupach otrzymujących wysokie dawki i w grupach kontrolnych. W przypadku wykrycia zmian w oczach związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej należy przebadać wszystkie zwierzęta. Jeśli wyniki analizy strukturalnej lub inne informacje wskazują na toksyczność dla oczu, należy zwiększyć częstotliwość badania oczu.

39. W przypadku substancji chemicznych, dla których poprzednie 28-dniowe lub 90-dniowe badania toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem wykazały prawdopodobieństwo wywoływania działania neurotoksycznego i reaktywność na różnego typu bodźce (32) (np. bodźce słuchowe, wizualne i proprioceptywne) (33) (34) (35), przed rozpoczęciem badania oraz co 3 miesiące po rozpoczęciu badania przez okres do 12 miesięcy, a także wraz z zakończeniem badania (jeśli jego czas trwania jest dłuższy niż 12 miesięcy) można przeprowadzić ocenę siły uchwytu (36) oraz ocenę aktywności motorycznej (37). Dalsze szczegółowe informacje na temat procedur, jakie można zastosować, podano w odpowiednich odniesieniach. Można jednak także zastosować również procedury inne niż te podane w odniesieniach.

▼M4

40. W przypadku substancji chemicznych, dla których poprzednie 28-dniowe lub 90-dniowe badania toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem wykazały prawdopodobieństwo wywoływania działania immunotoksycznego, dalsze badania tego parametru docelowego można przeprowadzić wraz z zakończeniem badania.

Masa ciała, spożycie pokarmu/wody i wydajność pokarmu

41. Wszystkie zwierzęta należy zważyć na początku rozpoczęcia poddawania ich działaniu substancji badanej, a także co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Pomiarów spożycia pokarmu i wydajności pokarmu należy dokonywać co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Spożycie wody należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu, jeśli substancję badaną podaje się wraz z wodą pitną. Pomiary spożycia wody należy rozważyć także w przypadku badań, w których zaszły zmiany związane ze spożyciem wody.

Hematologia i biochemia kliniczna

42. W przypadku badań z wykorzystaniem gryzoni badania hematologiczne należy przeprowadzać u wszystkich badanych zwierząt (10 samców i 10 samic w każdej grupie) po upływie 3, 6 i 12 miesięcy, a także wraz z zakończeniem badania (jeśli jego czas trwania jest dłuższy niż 12 miesięcy). W przypadku wykorzystania w badaniu myszy konieczne może być uwzględnienie zwierząt satelitarnych w celu przeprowadzenia wszystkich wymaganych oznaczeń hematologicznych (zob. pkt 19). W badaniach z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie próbki należy pobierać od mniejszej liczby zwierząt (np. od 4 zwierząt dla każdej płci i grupy w badaniach z wykorzystaniem psów), w trakcie badania oraz wraz z jego zakończeniem, tak jak zostało to opisane w przypadku badań z wykorzystaniem gryzoni. Nie ma konieczności przeprowadzania pomiarów po upływie 3 miesięcy, zarówno w przypadku gryzoni, jak i gatunków innych niż gryzonie, jeśli w poprzednim 90-dniowym badaniu przeprowadzonym przy porównywalnych poziomach dawek nie odnotowano zmian parametrów hematologicznych. Próbki krwi należy pobrać z określonego miejsca, na przykład poprzez nakłucie serca lub z zatoki oczodołowej tylnej, w znieczuleniu.

43. Należy zbadać parametry z następującej listy (38): całkowitą i różnicową liczbę leukocytów, liczbę erytrocytów, liczbę płytek krwi, stężenie hemoglobiny, hematokryt (HCT), średnią objętość erytrocytów (MCV), średnią masę hemoglobiny w erytrocycie (MCH), średnie stężenie hemoglobiny w erytrocytach (MCHC), czas protrombinowy oraz czas częściowej tromboplastyny po aktywacji. Inne parametry hematologiczne, takie jak ciałka Heinza lub inne nietypowe parametry morfologii erytrocytów lub methemoglobiny, mogą zostać zmierzone w stosownych przypadkach, w zależności od toksyczności substancji badanej. Zasadniczo należy przyjąć elastyczne podejście, dostosowane do obserwowanych lub spodziewanych skutków działania danej substancji badanej. Jeśli substancja badana ma wpływ na układ krwiotwórczy, można również przeprowadzić badanie liczby retikulocytów i cytologię szpiku kostnego, choć takie badania nie muszą być przeprowadzane w ramach badań rutynowych.

44. Oznaczenia parametrów biochemii klinicznej w celu zbadania głównych skutków toksycznych w tkankach, a w szczególności skutków dla nerek i wątroby, należy wykonać na próbkach krwi pobranych od każdego zwierzęcia (10 samców i 10 samic z każdej grupy) w takich samych odstępach czasowych jak w przypadku badań hematologicznych. W przypadku wykorzystania w badaniu myszy konieczne może być wprowadzenie zwierząt satelitarnych w celu przeprowadzenia wszystkich wymaganych oznaczeń parametrów biochemii klinicznej. W badaniach z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie próbki należy pobierać od mniejszej liczby zwierząt

▼M4

(np. od 4 zwierząt dla każdej płci i grupy w badaniach z wykorzystaniem psów), w trakcie badania oraz wraz z jego zakończeniem, tak jak zostało to opisane w przypadku badań z wykorzystaniem gryzoni. Nie ma konieczności przeprowadzania pomiarów po upływie 3 miesięcy, zarówno w przypadku gryzoni, jak i gatunków innych niż gryzonie, jeśli w poprzednim 90-dniowym badaniu przeprowadzonym przy porównywalnych poziomach dawek nie odnotowano zmian parametrów biochemii klinicznej. Zalecane jest wstrzymanie podawania zwierzętom pokarmu (z wyjątkiem myszy) przez noc poprzedzającą pobranie krwi ([1]). Należy zbadać parametry z następującej listy (38): glukoza, mocznik (azot mocznikowy), kreatynina, białko całkowite, albumina, wapń, sód, potas, cholesterol całkowity, co najmniej dwa odpowiednie badania w celu oceny komórek wątroby (aminotransferaza alaninowa, aminotransferaza asparaginianowa, dehydrogenaza glutaminianowa, całkowite kwasy żółciowe) (39), oraz co najmniej dwa odpowiednie badania w celu oceny wątroby i dróg żółciowych (fosfataza alkaliczna, gamma-glutamylotranspeptydaza, 5'-nukleotydaza, bilirubina całkowita, całkowite kwasy żółciowe) (39). Inne parametry biochemii klinicznej, takie jak stężenie triglicerydów mierzone na czczo, poszczególne hormony oraz pseudocholinesteraza, można zbadać w stosownych przypadkach, w zależności od toksyczności substancji badanej. Zasadniczo należy przyjąć elastyczne podejście, dostosowane do obserwowanych lub spodziewanych skutków działania danej substancji badanej.

45. Oznaczenia analizy moczu należy przeprowadzić u wszystkich zwierząt wykorzystanych w badaniu (10 samców i 10 samic z każdej grupy), na próbkach pobranych w takich samych odstępach czasu jak w przypadku hematologii i biochemii klinicznej. Nie ma konieczności przeprowadzania pomiarów po upływie 3 miesięcy, jeśli w poprzednim 90-dniowym badaniu przeprowadzonym przy porównywalnych poziomach dawek nie odnotowano zmian w analizie moczu. Zalecenie eksperta dotyczące badań klinicznych pod kątem patologii obejmuje następującą listę parametrów (38): wygląd, objętość, osmolalność lub masa właściwa, pH, całkowite białko i glukoza. Inne oznaczenia obejmują ketony, urobilinogen, bilirubinę i krew utajoną. W stosownych przypadkach można zastosować badania dodatkowych parametrów w celu rozszerzenia badania zaobserwowanych skutków.

46. Ogólnie uznaje się, że podstawowe zmienne hematologiczne i biochemii klinicznej należy zbadać przed poddaniem zwierząt działaniu substancji badanej w przypadku badań z wykorzystaniem psów, jednak nie ma takiej potrzeby w przypadku badań z wykorzystaniem gryzoni (38). Jeśli jednak historyczne dane podstawowe (zob. pkt 58) są nieodpowiednie, należy rozważyć wygenerowanie takich danych.

PATOLOGIA

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

47. Wszystkie zwierzęta wykorzystane w badaniu należy zazwyczaj poddać pełnemu, szczegółowemu rozpoznaniu histopatologicznemu, które obejmuje staranne zbadanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszystkich otworów, jamy czaszki, jamy klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Można jednak założyć (w grupach przewidzianych do uśmiercenia w trakcie trwania doświadczenia i w grupach satelitarnych) ograniczenie pomiarów do poszczególnych kluczowych działań, takich jak badanie neurotoksyczności lub immunotoksyczności (zob. pkt 21). Takie zwierzęta nie muszą zostać poddane rozpoznaniu histopatologicznemu ani dalszym procedurom opisanym w poniższych ustępach. Zwierzęta wskaźnikowe mogą wymagać rozpoznania histopatologicznego w zależności od poszczególnych przypadków, według uznania kierownika badania.

([1]) W odniesieniu do niektórych pomiarów dotyczących surowicy i osocza, w szczególności dla glukozy, zaleca się wstrzymanie podawania pokarmu przez noc. Zalecenie to wynika głównie z faktu, że zwiększona zmienność, którą nieuchronnie powoduje brak wstrzymania podawania pokarmu, często maskuje bardziej subtelne skutki, co utrudnia interpretację wyników. Należy jednak zauważyć, że wstrzymanie podawania pokarmu przez noc może wpływać na ogólny metabolizm zwierząt, a w szczególności w badaniach żywieniowych może zakłócać dzienne narażenie na działanie substancji badanej. Wszystkie zwierzęta powinny zostać poddane ocenie, będąc w tym samym stanie fizjologicznym, i dlatego szczegółowe oceny lub oceny neurologiczne najlepiej zaplanować na inny dzień niż dzień pobierania próbek na potrzeby zbadania parametrów biochemii klinicznej.

▼**M4**

48. Należy odnotować masy organów wszystkich zwierząt, prócz tych wyłączonych na mocy drugiej części pkt 47. Nadnercza, mózg, najądrza, serce, nerki, wątrobę, jajniki, śledzionę, jądra, tarczycę (zważoną po utrwaleniu, z przytarczycami) oraz macicę pobrane od wszystkich zwierząt (oprócz tych w stanie agonalnym lub uśmierconych w czasie trwania badania) należy w stosownych przypadkach okroić z wszelkich przylegających tkanek i zmierzyć ich wagę mokrą możliwie jak najszybciej po sekcji w celu zapobiegnięcia ich wyschnięciu.

49. Następujące tkanki należy zachować w roztworze utrwalającym najbardziej odpowiednim zarówno dla rodzaju tkanki, jak i planowanego późniejszego badania histopatologicznego (40) (tkanki podane w nawiasach kwadratowych są opcjonalne):

wszystkie wyraźne zmiany	serce	trzustka	żołądek (przedżołądek, żołądek gruczołowy)
nadnercze	jelito kręte	przytarczyca	[zęby]
aorta	jelito czcze	nerw obwodowy	jądro
mózg (w tym części kresomózgowia, móżdżka i rdzenia/mostu)	nerka	przysadka	grasica
jelito ślepe	gruczoł łzowy	prostata	tarczyca
szyjka macicy	wątroba	odbytnica	[język]
gruczoł koagulujący	płuco	gruczoł ślinowy	tchawica
okrężnica	węzły chłonne (powierzchowne i głębokie)	pęcherzyk nasienny	pęcherz moczowy
dwunastnica	gruczoł mlekowy (obowiązkowo w przypadku samic oraz, jeśli wyraźnie nadaje się do analizy, również w przypadku samców)	mięsień szkieletowy	macica (w tym szyjka macicy)
najądrze	[górne drogi oddechowe, w tym nos, małżowiny nosowe oraz zatoki przynosowe]	skóra	[moczowód]
oko (w tym siatkówka)	przełyk	rdzeń kręgowy (na trzech odcinkach: szyjnym, śródpiersiowym i lędźwiowym)	[cewka moczowa]
[kość udowa ze stawem]	[opuszka węchowa]	śledziona	pochwa
pęcherzyk żółciowy (w przypadku gatunków innych niż szczur)	jajnik	[mostek]	odcinek szpiku kostnego lub świeżego aspiratu szpiku kostnego
gruczoł przyoczny			

▼M4

W przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy utrwalić obydwa organy. Wyniki badań klinicznych i innych badań mogą wskazać na konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Organy uznane za prawdopodobne organy docelowe, w oparciu o znane właściwości substancji badanej, także należy zachować. W przypadku badań z zastosowaniem dermalnej drogi podania należy zbadać organy zgodnie z listą określoną dla podania drogą pokarmową, przy czym kluczowe jest pobranie i zachowanie próbek skóry z miejsca aplikacji. W przypadku badań z zastosowaniem inhalacyjnej drogi podania, układając listę tkanek z dróg oddechowych do zachowania i zbadania, należy kierować się zaleceniami zawartymi w rozdziale B.8 niniejszego załącznika (9) i B.29 niniejszego załącznika (10). W przypadku innych organów/tkanek (oraz w uzupełnieniu określonych utrwalonych tkanek z dróg oddechowych) należy zbadać organy zgodnie z listą określoną dla pokarmowej drogi podania.

Histopatologia

50. Dostępne są wytyczne dotyczące najlepszych praktyk związanych z przeprowadzaniem toksykologicznych badań zmian patologicznych (40). Należy zbadać pod kątem histopatologii co najmniej następujące tkanki:

— wszystkie tkanki zwierząt z grup otrzymujących wysokie dawki i z grup kontrolnych,

— wszystkie tkanki zwierząt w stanie agonalnym lub uśmierconych podczas badania,

— wszystkie tkanki wykazujące makroskopowe nieprawidłowości,

— tkanki docelowe lub tkanki, które wykazują zmiany spowodowane poddaniem zwierzęcia działaniu substancji badanej w grupie otrzymującej wysokie dawki, pobrane od wszystkich zwierząt we wszystkich innych grupach otrzymujących dawki,

— w przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy zbadać obydwa organy.

OBSERWACJE (ETAP BADANIA RAKOTWÓRCZOŚCI)

51. Wszystkie zwierzęta należy sprawdzić pod kątem chorobowości i upadkowości, zazwyczaj na początku i pod koniec każdego dnia, włącznie z weekendami i dniami wolnymi od pracy. Dodatkowo zwierzęta należy sprawdzać raz dziennie pod kątem szczególnych objawów istotnych z toksykologicznego punktu widzenia. W przypadku badań z wykorzystaniem sondy zwierzęta należy sprawdzać w okresie bezpośrednio po dawkowaniu. Szczególną uwagę należy zwrócić na rozwój guzów; należy odnotować czas pojawienia się guza, jego położenie, wymiary, wygląd oraz progresję każdego wyraźnie widocznego lub wyczuwalnego guza.

52. Wszystkie zwierzęta należy zważyć na początku rozpoczęcia poddawania ich działaniu substancji badanej, a także co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Pomiarów spożycia pokarmu i wydajności pokarmu należy dokonywać co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Spożycie wody należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu, jeśli substancję badaną podaje się wraz z wodą pitną. Pomiary spożycia wody należy rozważyć także w przypadku badań, w których zaszły zmiany związane ze spożyciem wody.

▼M4

Hematologia, biochemia kliniczna i inne pomiary

53. W celu zmaksymalizowania informacji uzyskanych dzięki badaniu, zwłaszcza na temat kwestii związanych ze sposobem działania, próbki krwi można poddać analizie parametrów hematologii i biochemii klinicznej, według uznania kierownika badania. Właściwe może być także przeprowadzenie analizy moczu. Informacji na temat tych parametrów dostarczą dane dotyczące zwierząt wykorzystanych na etapie badania toksyczności przewlekłej, zazwyczaj dotyczące okresu 12 miesięcy (pkt 34). Dalsze wytyczne dotyczące wartości pobrania takich próbek w ramach badania rakotwórczości przedstawiono w wytycznych nr 116 (7). Jeśli pobiera się próbki krwi, należy pobierać je pod koniec okresu badania, tuż przed procedurą uśmiercania zwierząt lub w jej trakcie. Próbki krwi należy pobrać z określonego miejsca, na przykład poprzez nakłucie serca lub z zatoki oczodołowej tylnej, w znieczuleniu. Do zbadania można przygotować również rozmazy krwi, zwłaszcza jeśli organem docelowym wydaje się szpik kostny, choć wartość takiego badania rozmazów krwi na etapie badania rakotwórczości w celu oceny rakotwórczości/potencjału onkogenicznego została zakwestionowana (38).

PATOLOGIA

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

54. Wszystkie zwierzęta wykorzystane w badaniu, prócz zwierząt wskaźnikowych oraz innych zwierząt satelitarnych (zob. pkt 20), należy poddać pełnemu, szczegółowemu rozpoznaniu histopatologicznemu, które obejmuje staranne zbadanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszystkich otworów, jamy czaszki, jamy klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Zwierzęta wskaźnikowe i inne zwierzęta satelitarne mogą wymagać rozpoznania histopatologicznego w zależności od poszczególnych przypadków, według uznania kierownika badania. Masa organów nie jest zazwyczaj częścią badania rakotwórczości, jako że w organach zachodzą zmiany związane z wiekiem, a rozwój guzów na późniejszych etapach uniemożliwia wykorzystanie takich danych. Takie dane mogą mieć jednak kluczowe znaczenie dla oszacowania wagi dowodów, w szczególności w kontekście kwestii związanych ze sposobem działania. Jeśli stanowią one część badania satelitarnego, takie dane należy zgromadzić nie później niż rok po rozpoczęciu badania.

55. Następujące tkanki należy zachować w roztworze utrwalającym najbardziej odpowiednim zarówno dla rodzaju tkanki, jak i planowanego późniejszego badania histopatologicznego (40) (tkanki podane w nawiasach kwadratowych są opcjonalne):

wszystkie wyraźne zmiany	serce	trzustka	żołądek (przedżołądek, żołądek gruczołowy)
nadnercze	jelito kręte	przytarczyca	[zęby]
aorta	jelito czcze	nerw obwodowy	jądro
mózg (w tym części kresomózgowia, móżdżka i rdzenia/mostu)	nerka	przysadka	grasica
jelito ślepe	gruczoł łzowy	prostata	tarczyca
szyjka macicy	wątroba	odbytnica	[język]
gruczoł koagulujący	płuco	gruczoł ślinowy	tchawica
okrężnica	węzły chłonne (powierzchowne i głębokie)	pęcherzyk nasienny	pęcherz moczowy

▼M4

dwunastnica	gruczoł mlekowy (obowiązkowo w przypadku samic oraz, jeśli wyraźnie nadaje się do analizy, również w przypadku samców)	mięsień szkieletowy	macica (w tym szyjka macicy)
najądrze	[górne drogi oddechowe, w tym nos, małżowiny nosowe oraz zatoki przynosowe]	skóra	[moczowód]
oko (w tym siatkówka)	przełyk	rdzeń kręgowy (na trzech odcinkach: szyjnym, śródpiersiowym i lędźwiowym)	[cewka moczowa]
[kość udowa ze stawem]	[opuszka węchowa]	śledziona	pochwa
pęcherzyk żółciowy (w przypadku gatunków innych niż szczur)	jajnik	[mostek]	odcinek szpiku kostnego lub świeżego aspiratu szpiku kostnego
gruczoł przyoczny			

W przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy utrwalić obydwa organy. Wyniki badań klinicznych i inne ustalenia mogą wskazać na konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Organy uznane za prawdopodobne organy docelowe, w oparciu o znane właściwości substancji badanej, także należy zachować. W przypadku badań z zastosowaniem dermalnej drogi podania należy zbadać organy zgodnie z listą określoną dla podania drogą pokarmową, przy czym konieczne jest pobranie i zachowanie próbek skóry z miejsca aplikacji. W przypadku badań z zastosowaniem inhalacyjnej drogi podania, układając listę tkanek z dróg oddechowych do zachowania i zbadania, należy kierować się zaleceniami zawartymi w rozdziale B.8 niniejszego załącznika (8) i B.29 niniejszego załącznika (9). W przypadku innych organów/tkanek (oraz w uzupełnieniu określonych utrwalonych tkanek z dróg oddechowych) należy zbadać organy zgodnie z listą określoną dla pokarmowej drogi podania.

Histopatologia

56. Dostępne są wytyczne dotyczące najlepszych praktyk związanych z przeprowadzaniem toksykologicznych badań zmian patologicznych (40). Należy zbadać co najmniej następujące tkanki:

— wszystkie tkanki zwierząt z grup otrzymujących wysokie dawki i z grup kontrolnych,

— wszystkie tkanki zwierząt w stanie agonalnym lub uśmierconych podczas badania,

— wszystkie tkanki wykazujące makroskopowe nieprawidłowości, w tym guzy,

— w przypadku zaobserwowania w grupie otrzymującej wysoką dawkę histopatologicznych zmian związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej, należy zbadać takie same tkanki pochodzące od wszystkich zwierząt ze wszystkich pozostałych grup otrzymujących dawki,

— w przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy zbadać obydwa organy.

▼M4

DANE ORAZ SPORZĄDZENIE SPRAWOZDANIA (RAKOTWÓRCZOŚĆ I TOKSYCZNOŚĆ PRZEWLEKŁA)

Dane

57. Należy przedstawić dane dotyczące każdego zwierzęcia, w odniesieniu do wszystkich parametrów poddawanych oszacowaniu. Dodatkowo wszystkie dane należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które padły w trakcie trwania badania lub które uśmiercono z przyczyn humanitarnych, wraz z określeniem czasu, w którym nastąpiła śmierć lub humanitarne uśmiercenie, liczbę zwierząt wykazujących objawy toksyczności, opis obserwowanych objawów toksyczności, w tym czas ich pojawienia się, czas trwania, stopień ostrości wszelkich skutków toksycznych, liczbę zwierząt wykazujących zmiany, typ takich zmian oraz procent zwierząt wykazujących każdy typ zmiany. W tabelach z zestawieniem danych, oprócz klasyfikacji zmian, należy przedstawić średnie i odchylenia standardowe (dla danych z badań ciągłych) dotyczące zwierząt wykazujących skutki toksyczne lub zmiany.

58. Historyczne dane kontrolne mogą być cenne przy interpretacji wyników badania, np. jeśli istnieją przesłanki, że dane uzyskane z jednoczesnych kontroli są w sposób znaczący niestandardowe w porównaniu z najnowszymi danymi dotyczącymi zwierząt kontrolnych z tego samego obiektu/badanej kolonii. Historyczne dane kontrolne, jeśli poddaje się je oszacowaniu, powinny przedstawić to samo laboratorium i powinny się odnosić do zwierząt w tym samym wieku i z tego samego szczepu, oraz dane takie powinny zostać wygenerowane w ciągu pięciu lat przed rozpoczęciem rozważanego badania.

59. W stosownych przypadkach wyniki liczbowe należy poddawać oszacowaniu za pomocą właściwych i ogólnie przyjętych metod statystycznych. Metody statystyczne i dane poddawane analizie należy wybrać w czasie przygotowywania układu badania (pkt 9). Taki wybór powinien uwzględniać w razie konieczności korektę uwzględniającą zwierzęta, które przeżyły.

60. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— cechy fizyczne, czystość i własności fizykochemiczne,

— dane identyfikacyjne,

— źródło substancji chemicznej,

— numer partii,

— świadectwo analizy chemicznej.

Nośnik (w stosownych przypadkach)

— uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda).

Badane zwierzęta

— wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie takiego wyboru,

— liczba, wiek i płeć zwierząt na początku badaniu,

— źródło, warunki przebywania, pokarm itp.,

— masa ciała poszczególnych zwierząt na początku badania.

▼M4

Warunki badania

— uzasadnienie drogi podania i doboru dawek,

— w stosownych przypadkach metody statystyczne zastosowane do analizy danych,

— szczegółowe informacje na temat postaci użytkowej substancji badanej/przygotowywania pokarmu,

— dane analityczne dotyczące osiąganego stężenia, stabilności i jednorodności preparatu,

— droga podania i szczegółowe dane dotyczące podawania substancji badanej,

— w przypadku badań z inhalacyjną drogą podania informacje o tym, czy podanie odbywa się wyłącznie przez nos czy przez całe ciało,

— dawki rzeczywiste (mg/kg masy ciała/dzień), wskaźnik konwersji stężenia substancji badanej w pokarmie/wodzie pitnej (mg/kg lub ppm) do dawki rzeczywistej, jeśli ma to zastosowanie,

— szczegółowe informacje o pokarmie i jakości wody.

Wyniki (należy przedstawić zestawienie danych w tabeli oraz dane dotyczące poszczególnych zwierząt):

Wymogi ogólne

— dane dotyczące zwierząt, które przeżyły,

— masa ciała/zmiany masy ciała,

— dane dotyczące spożycia pokarmu, wyliczenia wydajności pokarmu, jeśli przeprowadzono, oraz dane dotyczące spożycia wody, jeśli dostępne,

— dane toksykokinetyczne, jeśli dostępne,

— oftalmoskopia (jeśli takie dane są dostępne),

— hematologia (jeśli takie dane są dostępne),

— biochemia kliniczna (jeśli takie dane są dostępne).

Ustalenia badań klinicznych

— objawy toksyczności,

— występowanie (i ostrość, jeśli poddano ją ocenie) wszelkich nieprawidłowości,

— rodzaj, ostrość i czas trwania obserwowanych objawów klinicznych (tak odwracalnych, jak i nieodwracalnych).

Dane dotyczące sekcji zwłok

— masa ciała w chwili zgonu,

— masa organów i ich współczynniki, jeśli takie dane są dostępne,

— ustalenia z sekcji zwłok; występowanie i stopień ostrości nieprawidłowości.

Histopatologia

— ustalenia histopatologiczne inne niż dotyczące nowotworów,

— ustalenia histopatologiczne dotyczące nowotworów,

▼M4

— korelacja między objawami makroskopowymi i mikroskopowymi,

— szczegółowy opis wszystkich ustaleń histopatologicznych związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej, w tym klasyfikacja ostrości skutków,

— sprawozdanie z ewentualnej wzajemnej oceny preparatów.

W stosownych przypadkach, statystyczne opracowanie wyników

Omówienie wyników, w tym:

— omówienie wszelkich podejść modelowych,

— zależność dawka-odpowiedź,

— historyczne dane kontrolne,

— rozważenie wszelkich informacji na temat sposobu działania,

— określenie BMD, NOAEL lub LOAEL,

— znaczenie dla ludzi.

Wnioski

BIBLIOGRAFIA:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rzym, 1995), wewnętrzny dokument roboczy, Dyrekcja ds. Środowiska, OECD, Paryż.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Waszyngton, D.C.

(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 i in. (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) Rozdział B.27 niniejszego załącznika. Badanie toksyczności podprzewlekłej drogą pokarmową – badanie toksyczności drogą pokarmową na gatunkach innych niż gryzonie metodą powtarzanej 90-dniowej dawki.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – wyd. drugie. Series on Testing and Assessment nr 116, dostępne na publicznej stronie OECD poświęconej wytycznym dotyczącym badań: www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment nr 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paryż.

(9) Rozdział B.8 niniejszego załącznika. Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (inhalacyjna).

(10) Rozdział B.29 niniejszego załącznika. Badanie podprzewlekłej toksyczności inhalacyjnej – 90-dniowe badania inhalacyjne z wykorzystaniem gatunków gryzoni.

(11) Rozdział B.9 niniejszego załącznika. Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (dermalna).

▼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. 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 i in. (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 i in. (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 i in. (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 i in. (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 nr 35 oraz Series on Pesticides nr 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paryż.

(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 nr 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paryż.

(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 (Międzynarodowy Instytut Nauk Biologicznych) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (red.). ILSI Press, Waszyngton, D.C.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN i 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 i Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. W: D'Arcy POF & Harron DWG (red.). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast, s. 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) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication nr 86-23. Waszyngton D.C., Departament Zdrowia i Opieki Społecznej Stanów Zjednoczonych.

(29) GV-SOLAS (Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, Gesellschaft für Versuchstierkunde, grudzień 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, 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 nr 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 i in. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198–201.

(39) EMEA, projekt dokumentu pt. „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (nr ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK i in. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICJA

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼B

B.34. **BADANIE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCJI JEDNEGO POKOLENIA**

1. **METODA**

1.1. WSTĘP

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

1.2. DEFINICJE

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Substancja testowa podawana jest w stopniowanych dawkach kilku grupom samców i samic. Samcom należy podawać dawkę w okresie wzrostu i przez co najmniej jeden pełny cykl spermatogenezy (około 56 dni u myszy i 70 dni u szczura), w celu wywołania przez substancję testową wszelkich negatywnych skutków na spermatogenezie.

Samice z pokolenia rodziców P powinny być poddane dawkowaniu przez co najmniej dwa pełne cykle rujowe w celu wywołania przez substancję testową wszelkich negatywnych skutków na cykl rajowy. Następnie zwierzęta zostają pokryte. Substancja testowa jest podawana obu płciom w okresie krycia a następnie jedynie samicom w okresie ciąży oraz przez okres ssania. W celu podania substancji przez drogi oddechowe, metoda będzie wymagać modyfikacji.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

Brak.

1.6. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.6.1. Przygotowania

Przed rozpoczęciem badania młode zdrowe zwierzęta są losowo przydzielane do grup badanych i kontrolnych. Zwierzęta podlegają warunkom przebywania i żywieniowym ustalonym do celów badania, przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania. Zalecane jest podawanie substancji testowej w pożywieniu lub w wodzie pitnej. Akceptowane są również inne drogi podawania substancji testowej. Ta sama metoda podawania substancji testowej powinna być stosowana do wszystkich zwierząt w trakcie odpowiedniego okresu badania. W przypadku użycia jakiegokolwiek nośnika lub innych dodatków w celu usprawnienia dawkowania należy upewnić się, iż nie powodują żadnych skutków toksyczności.

▼B

Dawkowanie należy przeprowadzać siedem dni w tygodniu.

1.6.2. Zwierzęta badane

Wybór gatunków Pożądanymi gatunkami są szczur i mysz. Należy wykorzystać zdrowe zwierzęta, które nie były wcześniej poddawane procedurom badawczym. Nie należy stosować szczepów o niskiej płodności. Badane zwierzęta należy scharakteryzować ze względu na gatunek, szczep, płeć, wagę i/lub wiek.

W celu odpowiedniego oszacowania płodności, należy poddać badaniu zarówno samice, jak i samce. Wszystkie zwierzęta badane i kontrolne należy odstawić od ssania przed rozpoczęciem dawkowania.

Liczba i płeć

Każda grupa doświadczalna i kontrolna powinna składać się z takiej liczby zwierząt, aby znalazło się w nich około 20 samic pod koniec ciąży.

Celem jest wyprodukowanie odpowiedniej liczby ciąż i potomstwa w celu zapewnienia znaczącej oceny wpływu substancji na płodność, ciążę i zachowanie macierzyńskie w pokoleniu zwierząt rodziców P i zwierząt ssących, wzrost i rozwój potomstwa F_1 w okresie od chwili poczęcia do zakończenia ssania.

1.6.3. Warunki badania

Pożywienie i woda powinny być dostępne bez ograniczeń. Tuż przed porodem ciężarne samice powinny być umieszczone w klatkach porodowych lub matczynych zaopatrzonych w materiał do zrobienia gniazda.

1.6.3.1. Poziomy dawkowania

Należy wykorzystać co najmniej trzy grupy badane i grupę kontrolną. W przypadku użycia nośnika w podawaniu substancji testowej, grupie kontrolnej należy podać nośnik o najwyższej wielkości dawki. W przypadku gdy substancja testowa zmniejsza pobieranie lub wykorzystanie pożywienia, może być niezbędne dołączenie odpowiednio żywionej grupy kontrolnej. Jeżeli dawka nie jest ograniczona fizyczno-chemicznymi lub biologicznymi właściwościami substancji, najwyższa wielkość dawki powinna wywoływać toksyczność, ale nie śmiertelność w grupie zwierząt rodziców P. Średnia dawka powinna wywoływać minimalne skutki toksyczności przypisane działaniu substancji testowej, a najniższa dawka nie powinna wywoływać żadnych niekorzystnych skutków u rodziców lub potomstwa. W przypadku substancji podawanej za pomocą dozownika lub w kapsułce dawka podawana każdemu zwierzęciu powinna być oparta na indywidualnej wadze ciała zwierzęcia i dostosowywana raz w tygodniu z uwzględnieniem zmian wagi ciała zwierzęcia. Poziom dawkowania dla samic w okresie ciąży może być oparty na wadze ciała w dniu 0 lub 6 dniu ciąży, w razie potrzeby.

1.6.3.2. Test graniczny

W przypadku substancji o niskiej toksyczności, jeżeli poziom dawki wynoszący, co najmniej 1 000 mg/kilogram nie powoduje żadnego szkodliwego wpływu na zdolność reprodukcyjną, badania przy zastosowaniu innych poziomów dawek mogą być uznane za niekonieczne. Jeżeli badania wstępne przy wysokim poziomie dawki, z wyraźnymi dowodami toksyczności matki, nie wykazują żadnego szkodliwego wpływu na płodność, badania przy zastosowaniu innych poziomów dawek mogą być uznane za niekonieczne.

▼B

1.6.3.3. Przeprowadzenie badania

Harmonogramy badań

Codzienne stosowanie dawki u rodzicielskich samców P powinno rozpocząć się po przekroczeniu od pięciu do dziewięciu tygodni życia po zaprzestaniu ssania i aklimatyzacji przez okres co najmniej pięciu dni. W przypadku szczurów dawkowanie odbywa się przez okres 10 tygodni przed okresem krycia (w przypadku myszy – osiem tygodni). Samce należy uśmiercić i zbadać na końcu okresu krycia albo, alternatywnie, mogą być zachowane, podając im pożywienie wykorzystywane w badaniu w celu ewentualnej produkcji drugiego miotu, a następnie powinny być uśmiercone i zbadane w okresie poprzedzającym zakończenie badań. W przypadku rodzicielskich samic P dawkowanie powinno rozpocząć się po co najmniej pięciodniowym okresie aklimatyzacji i kontynuowane przez okres co najmniej dwóch tygodni przed rozpoczęciem krycia. Codzienne dawkowanie rodzicielskich samic P powinno być kontynuowane przez trzytygodniowy okres krycia, ciąży aż do czasu zaprzestania ssania potomstwa F_1. Należy rozważyć zmodyfikowanie zasad dawkowania przy uwzględnieniu dostępnych informacji na temat substancji testowej, w szczególności pobudzania przez nią metabolizmu lub bioakumulacji.

Procedura krycia

W badaniach toksyczności reprodukcji można zastosować procedurę krycia zarówno 1:1 (jeden samiec i jedna samica), jak i 1:2 (jeden samiec i dwie samice).

W oparciu o procedurę krycia 1:1 jedną samicę należy umieścić z tym samym samcem aż do momentu pojawienia się ciąży lub przez okres trzech tygodni. Każdego dnia rano, samice należy poddać badaniu na obecność spermy lub czopów nasienia w pochwie. Dzień 0 danej ciąży jest określany w chwili wykrycia spermy lub czopu nasienia w pochwie.

Należy ustalić przyczynę wyraźnego braku płodności w odniesieniu do par, które nie zainicjują krycia.

Powyższe może obejmować takie procedury, jak ponowne, dodatkowe krycie z reproduktorami matek, mikroskopowe badanie organów rozrodczych oraz badania cyklu rujowego i cyklu spermatogenezy.

Wielkość miotu

Zwierzęta poddawane dawkowaniu w okresie badań płodności są dopuszczane do miotu i wychowują swoje potomstwo do chwili zaprzestania ssania bez normalizacji miotów.

W przypadku dokonania normalizacji zaleca się następującą procedurę. Między 1 a 4 dniem po porodzie rozmiar każdego miotu może zostać dostosowany przez wyeliminowanie dodatkowych młodych w miocie, na tyle na ile to możliwe, cztery samice i cztery samce na miot.

W każdym przypadku gdy liczba młodych samców lub samic uniemożliwia zachowanie czterech osobników danej płci w każdym miocie, akceptowane jest częściowe dostosowanie (np. pięć samców i trzy samice). Nie należy przeprowadzać dostosowania w odniesieniu do miotów o liczbie osobników mniejszej niż osiem.

▼B

1.6.4. Obserwacje

Przez cały okres badań każde zwierzę powinno być obserwowane co najmniej raz dziennie. Należy odnotować zmiany w zachowaniu mające związek z badaniami, objawy trudnego lub długotrwałego porodu oraz wszelkie objawy toksyczności, włączając śmiertelność. W okresie poprzedzającym krycie oraz w okresach krycia, spożycie żywności może być kontrolowane codziennie. Po porodzie oraz podczas okresu laktacji pomiary spożycia żywności (i pomiary spożycia wody, w przypadku gdy substancja testowa podawana jest w wodzie pitnej) należy sporządzać w tym samym dniu co ważenie miotu. Rodzicielskie samce i samice P należy ważyć w pierwszym dniu rozpoczęcia dawkowania i następnie w odstępach tygodniowych. Niniejsze uwagi należy odnotować indywidualnie dla każdego dorosłego zwierzęcia.

Czas trwania ciąży należy obliczać, począwszy od dnia 0. Każdy miot należy zbadać, jeżeli możliwe, natychmiast po porodzie celem ustalenia liczby oraz płci młodych, liczby martwo urodzonych, żywo urodzonych oraz obecność rażących nieprawidłowości.

Martwe młode oraz młode uśmiercone w 4 dniu należy zachować celem wykonania badań odnośnie do ewentualnych wad. Należy przeliczyć żywe młode i zważyć mioty nazajutrz po porodzie oraz w 4 i 7 dniu, a następnie w odstępach tygodniowych aż do czasu zakończenia badań, gdzie zwierzęta należy zbadać indywidualnie.

Należy odnotować obserwowalne nieprawidłowości fizyczne lub dotyczące zachowania u matek lub potomstwa.

1.6.5. Patologia

1.6.5.1. Sekcja zwłok

W chwili uśmiercenia lub zgonu zwierzęcia podczas badania zwierzęta pokolenia rodziców P powinny zostać poddane badaniom mikroskopowym w celu wykrycia wszelkich strukturalnych nieprawidłowości lub zmian patologicznych, ze zwróceniem szczególnej uwagi na organy systemu rozrodczego. Należy zbadać martwe lub konające młode w celu wykrycia uszkodzeń.

1.6.5.1. Histopatologia

Jajniki, macica, szyjka macicy, pochwa, jądra, najądrza, kanaliki nasienne, gruczoł krokowy, gruczoł opuszkowo-cewkowy, przysadka mózgowa i organ (organy) docelowe wszystkich zwierząt P należy zachować celem poddania badaniu mikroskopowemu. W przypadku gdy niniejsze organy nie zostały przebadane w trakcie innych badań z wykorzystaniem wielu poziomy dawek, należy przeprowadzić ich badanie u wszystkich zwierząt grupy najwyższego dawkowania i kontrolnej, które padły w trakcie badań, w takim stopniu w jakim jest to możliwe.

Organy takich zwierząt, wykazujące objawy nieprawidłowości, powinny zostać zbadane u wszystkich zwierząt P. W tych przypadkach badanie mikroskopowe należy przeprowadzić na wszystkich tkankach wykazujących zmiany patologiczne. Jak sugerowano zgodnie z procedurami krycia, organy rozrodcze zwierząt podejrzanych o brak płodności mogą być poddane badaniu mikroskopowemu.

▼B

2. **DANE**

Dane powinny zostać podsumowane w formie tabeli, wskazującej liczbę zwierząt każdej badanej grupy na początku badań, liczbę płodnych samców, liczbę ciężarnych samic, rodzaje zmian i procent zwierząt wykazujących każdy rodzaj zmian.

Jeżeli możliwe, wyniki numeryczne powinny zostać oszacowane właściwą metodą statystyczną. Można zastosować każdą uznaną metodę statystyczną.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań zawiera, jeżeli możliwe, następujące informacje:

— wykorzystany gatunek/szczep,

— dane dotyczące reakcji na toksyczność ze względu na płeć i dawkę, włączając płodność, ciążę i zdolność utrzymania się przy życiu,

— czas zgonu podczas badań lub informacja o tym, czy zwierzęta przetrwały do czasu planowanego uśmiercenia lub zakończenia badań,

— tabela przedstawiająca wagę każdego miotu, średnią wagę młodych i wagę poszczególnych młodych przy zakończeniu badań,

— wpływ toksyczności lub innych skutków na reprodukcję, potomstwo i rozwój poporodowy,

— dzień obserwacji każdego nietypowego objawu i późniejszego postępowania,

— dane dotyczące wagi ciała dla zwierząt P,

— wyniki badań sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników badań mikroskopowych,

— statystyczne ujęcie wyników, tam gdzie jest to stosowane,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. ANALIZA I INTERPRETACJA

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

4. **ODNIESIENIA**

Zob. Wprowadzenie ogólne część B.

▼B

B.35. **DWUPOKOLENIOWE BADANIE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCYJNEJ**

1. **METODA**

Niniejsza metoda jest analogiczna do OECD TG 416 (2001).

1.1. WSTĘP

Metoda badania toksyczności reprodukcji dwóch pokoleń opracowana została w celu uzyskania ogólnych informacji dotyczących skutków oddziaływania substancji testowej na integralność i działanie męskich i żeńskich układów rozrodczych, wliczając w to funkcję gruczołów rozrodczych, cykl rujowy, zachowanie kopulacyjne, zapłodnienie, ciążę, poród, laktację i zaprzestanie ssania, jak również wzrost i rozwój potomstwa. Badanie może również dostarczyć informacji dotyczących skutków substancji testowej wywieranych na zachorowalność noworodków, śmiertelności oraz wstępnych danych dotyczących przedporodowej i poporodowej toksyczności rozwojowej, oraz służyć jako wskazówka do następnych badań. Poza badaniem wzrostu i rozwoju pokolenia F_1 omawiana metoda badania ma na celu ocenę integralności i działania męskich i żeńskich układów rozrodczych, jak również wzrostu i rozwoju pokolenia F_2. W celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących toksyczności rozwojowej i niedoborów funkcjonalnych można albo włączyć do niniejszego protokołu dodatkowe segmenty badań, uwzględniające właściwe metody badania toksyczności rozwojowej i/lub neurotoksyczności rozwojowej, lub też można badać te punkty końcowe w oddzielnych badaniach z wykorzystaniem właściwych metod.

1.2 ZASADA METODY BADAWCZEJ

Substancja testowa podawana jest w stopniowanych dawkach kilku grupom samców i samic. Samcom z pokolenia rodziców P należy podawać dawkę w okresie wzrostu i przez co najmniej jeden pełny cykl spermatogenezy (około 56 dni u myszy i 70 dni u szczura) w celu wywołania przez substancję testową wszelkich negatywnych skutków wywieranych na spermatogenezę. Skutek wywierany na spermę określa się poprzez szereg parametrów spermy (np. morfologię i ruchliwość spermy) oraz w czasie preparowania tkanek i szczegółowych badań histopatologicznych. Jeśli dostępne są dane dotyczące spermatogenezy z wcześniejszego badania powtarzanego dawkowania o wystarczającym czasie trwania, np. badania 90-dniowego, nie ma potrzeby obejmować oceną samców pokolenia P. Zaleca się jednak zachowanie próbek lub cyfrowych zapisów spermy pokolenia P, aby umożliwić późniejszą ocenę. Samice z pokolenia rodziców P powinny być poddane dawkowaniu w okresie ich rozwoju i przez kilka kompletnych cyklów rujowych, w celu wykrycia wszelkich negatywnych skutków wywieranych przez substancję testową na normalny przebieg cyklu rujowego. Substancja testowa jest podawana zwierzętom rodzicielskim (P) w okresie krycia, w okresie powstałych ciąży oraz przez okres ssania ich potomstwa F_1. Po zaprzestaniu ssania, należy kontynuować podawanie substancji testowej potomstwu F_1 w okresie jego rozwoju do osiągnięcia dorosłości, momentu kojarzenia w pary i produkcji potomstwa F_2, do chwili zaprzestania ssania potomstwa F_2.

Obserwacje kliniczne i badania patologiczne są przeprowadzane na wszystkich zwierzętach w kierunku oznak toksyczności, ze szczególnym uwzględnieniem skutków wywieranych na integralność i działanie układów rozrodczych samców i samic oraz na wzrost i rozwój potomstwa.

▼B

1.3 OPIS METODY BADAWCZEJ

1.3.1 **Wybór gatunków zwierząt**

Szczur jest pożądanym gatunkiem zwierzęcia do badań. Jeżeli zastosowano inne gatunki, należy podać uzasadnienie, a metoda będzie wymagać odpowiednich modyfikacji. Nie należy stosować szczepów o niskiej płodności lub powszechnie znanej wysokiej częstości występowania wad rozwojowych. W momencie rozpoczęcia doświadczenia odchylenia mas ciała wśród wykorzystywanych zwierząt powinny być jak najniższe i nie powinny przekraczać 20 % średniej masy ciała u każdej z płci.

1.3.2 **Warunki p rzeby w anią i warunki żywieniowe**

Temperatura w badawczych pomieszczeniach hodowlanych powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin jasno, 12 godzin ciemno. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Na wybór diety może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej domieszki substancji testowej przy podawaniu metodą powyższą.

Zwierzęta mogą być trzymane pojedynczo lub umieszczane w klatkach w małych grupach o tej samej płci. Procedury krycia przeprowadza się w klatkach nadających się do tego celu. Po stwierdzeniu, że kopulacja nastąpiła, pokryte samice powinny być umieszczone po jednej w klatkach porodowych lub matczynych. Pokryte zwierzęta mogą być również trzymane w małych grupach i oddzielane na jeden lub dwa dni przed porodem. Tuż przed porodem należy zapewnić pokrytym samicom właściwy i określony materiał do zrobienia gniazda.

1.3.3. **Przygotowanie zwierząt**

Należy wykorzystać zdrowe młode zwierzęta, które były aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez co najmniej 5 dni i które nie były wcześniej poddawane procedurom badawczym. Badane zwierzęta należy scharakteryzować ze względu na gatunek, szczep, źródło, płeć, wagę i/lub wiek. Należy określić stosunki pokrewieństwa w rodzeństwie wśród zwierząt w celu uniknięcia krycia rodzeństwem. Należy losowo przydzielić zwierzęta do grup kontrolnych i badanych (zaleca się dalszy podział według masy ciała). Klatki powinny być ustawione w taki sposób, żeby zminimalizować możliwy wpływ położenia klatki. Każdemu zwierzęciu powinno się nadać jednoznaczny numer identyfikacyjny. W pokoleniu P należy to zrobić przed rozpoczęciem dawkowania. W pokoleniu F_1 należy to zrobić w momencie zakończenia ssania przez zwierzęta wybrane do krycia. Należy prowadzić zapisy wskazujące pochodzenie z miotu dla wszystkich wybranych zwierząt z pokolenia F_1. Jeśli rozważa się indywidualne ważenie młodych lub jakiekolwiek obserwacje funkcjonalne, zaleca się ponadto indywidualną identyfikację młodych tak szybko po urodzeniu, jak to możliwe.

W momencie rozpoczęcia dawkowania zwierzęta pokolenia rodzicielskiego (P) powinny być w wieku 5–9 tygodni. Na ile to praktycznie możliwe, zwierzęta wszystkich grup badanych powinny być jednakowej masy ciała i jednego wieku.

▼B

1.4 PROCEDURA

1.4.1 **Liczba i płeć zwierząt**

Każda grupa badana i kontrolna powinna składać się z takiej liczby zwierząt, aby znalazło się w nich około 20 samic pod koniec ciąży. Może nie być to możliwe w przypadku substancji powodujących niepożądane skutki związane z podawaniem (np. niepłodność, nadmierną toksyczność przy najwyższym dawkowaniu). Celem jest wyprodukowanie odpowiedniej liczby ciąż w celu zapewnienia znaczącej oceny ewentualnego wpływu substancji na płodność, ciążę i zachowanie macierzyńskie w pokoleniu zwierząt rodziców P i ssących młodych, wzrost i rozwój potomstwa F_1 w okresie od chwili poczęcia do osiągnięcia dojrzałości płciowej oraz na rozwój ich potomstwa (F_2) do zakończenia ssania. A zatem nieosiągnięcie pożądanej liczby ciężarnych zwierząt (tj. 20) nie musi oznaczać konieczności unieważnienia badania i powinno być ocenione oddzielnie dla każdego przypadku.

1.4.2 **Przygotowanie dawek**

Zaleca się podawanie doustne (z pożywieniem, wodą pitną lub dozownikiem), jeżeli nie uznano za właściwą innej drogi podawania (np. naskórnej lub wziewnej).

W przypadku gdy to konieczne, substancja testowa jest rozpuszczona lub ma postać zawiesiny w odpowiednim nośniku. Zaleca się, aby – jeżeli to możliwe – najpierw było rozważone użycie wodnego roztworu/zawiesiny, następnie roztworu/emulsji w oleju (np. olej kukurydziany), a potem możliwy roztwór w innym nośnikach. W przypadku nośników niewodnych musi być znana charakterystyka toksyczna nośnika. Powinna być określona trwałość substancji testowej w nośniku.

1.4.3. **Dawkowanie**

Należy wykorzystać co najmniej trzy poziomy dawki i równoczesną kontrolę. Jeżeli charakter fizykochemiczny lub skutki biologiczne substancji testowej nie powodują ograniczenia, najwyższą dawkę należy dobrać w taki sposób, aby wywołać pewną toksyczność, ale nie śmierć lub poważne cierpienie. W przypadku nieoczekiwanej śmiertelności, badanie ze śmiertelnością mniejszą niż ok. 10 % zwierząt rodzicielskich (P) będzie zazwyczaj do przyjęcia. Należy zastosować sekwencję coraz mniejszych dawek, aby zademonstrować wszelkie reakcje związane z dawkowaniem i określić poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się niekorzystnych skutków (NOAEL). Dwa do czterech interwałów dawkowania są często optymalne dla ustalenia malejących poziomów dawki i dodanie czwartej grupy badanej jest często bardziej pożądane niż stosowanie bardzo dużych interwałów (np. współczynnik większy od 10) między dawkowaniem. Dla badań, gdzie substancja testowa podawana jest w pożywieniu, interwał dawkowania nie powinien przekraczać współczynnika 3. Poziomy dawkowania należy dobierać z uwzględnieniem wszelkich dostępnych danych o toksyczności, szczególnie z badań powtarzanego dawkowania. Należy uwzględnić wszelkie dostępne informacje o metabolizmie i kinetyce związku testowego lub odnośne materiały. Informacje te pomogą nadto w wykazaniu właściwego doboru reżimu dawkowania.

▼B

Grupa kontrolna powinna być grupą niepoddawaną dawkowaniu lub grupą kontrolną nośnika, jeśli nośnik zastosowano do podawania substancji testowej. Z wyjątkiem poddawania dawkowaniu substancji testowej, zwierzęta w grupie kontrolnej powinny być traktowane identycznie jak zwierzęta będące przedmiotem badania. Jeśli wykorzystywany jest nośnik, grupa kontrolna otrzymuje nośnik w najwyższej stosowanej objętości. Jeżeli substancja testowa jest podawana z pożywieniem i powoduje obniżenie spożycia lub wykorzystania pokarmu, można rozważyć konieczność użycia grupy kontrolnej karmionych par. Zamiast jednoczesnej grupy kontrolnej karmionych par można, alternatywnie, wykorzystać badania kontrolowane zaprojektowane w celu określenia wpływu obniżonej konsumpcji pokarmu na parametry reprodukcyjne.

Należy uwzględnić następujące charakterystyki nośnika lub innych domieszek: skutek wywierany na absorpcję, dystrybucję, metabolizm oraz na zatrzymywanie lub ekskrecję substancji testowej; skutki wywierane na chemiczne własności substancji testowej, które mogą zmienić jej charakterystykę toksyczną; należy również uwzględnić wpływ na pobieranie pokarmu lub wody, lub stan odżywienia zwierząt.

1.4.4. **Test graniczny**

Jeżeli badanie z podawaniem doustnym przy jednym poziomie dawki równym co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała/dzień, lub równoważny procent w pożywieniu lub wodzie pitnej (na podstawie ustalonej masy ciała), w przypadku podawania w pożywieniu lub wodzie pitnej, stosując procedury opisane dla tego badania, nie wywołuje widocznych objawów zatrucia ani u zwierząt rodzicielskich, ani u ich potomstwa, i jeżeli nie należałoby spodziewać się toksyczności na podstawie danych dotyczących substancji strukturalnie pokrewnych i/lub powiązanych metabolicznie, wtedy pełne badanie przy użyciu trzech poziomów dawki może nie być uznane za konieczne. Ten test graniczny stosuje się z wyjątkiem przypadków, w których ekspozycja ludzi wskazuje na konieczność użycia wyższego poziomu dawki doustnej. W odniesieniu do innych dróg podawania, na przykład wziewnej lub stosowania na skórę, własności fizyczne i chemiczne substancji testowej, jak np. rozpuszczalność, mogą często wskazywać i ograniczać najwyższy możliwy do osiągnięcia poziom ekspozycji.

1.4.5. **Podawanie**

Zwierzętom podaje się substancję testową przez siedem dni w tygodniu. Pożądane jest podawanie doustne (z pokarmem, wodą pitną lub dozownikiem). Jeśli zastosowano inną drogę podawania, należy podać uzasadnienie; mogą też być konieczne właściwe modyfikacje. Wszystkim zwierzętom podaje się dawki tą samą metodą w czasie odpowiedniego okresu doświadczalnego. Kiedy podaje się substancję dozownikiem, powinno się to wykonywać za pomocą zgłębnika do żołądka. Objętość cieczy, która może być podana jednorazowo nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała (0,4 ml/100 g masy ciała jest maksymalną objętością przy stosowaniu oleju kukurydzianego), z wyjątkiem roztworów wodnych można użyć 2 ml/100 g masy ciała. Z wyjątkiem substancji drażniących lub korozyjnych, które zazwyczaj wywołują zaostrzone skutki, zmienność w testowej objętości powinna być zminimalizowana poprzez skorygowanie stężenia, aby uzyskać stałą objętość na wszystkich poziomach dawki. W badaniach z wykorzystaniem dozownika młode otrzymują substancję tylko drogą pośrednią przez mleko, dopóki nie rozpocznie się dawkowanie bezpośrednie po zaprzestaniu ssania. W badaniach, gdzie podaje się substancję testową w pożywieniu lub wodzie pitnej, młode otrzymują substancję bezpośrednio, kiedy zaczynają się samodzielnie odżywiać w ostatnim tygodniu okresu laktacji.

▼B

W przypadku substancji podawanych w pożywieniu lub wodzie pitnej ważne jest zapewnienie, aby wymagane ilości substancji testowej nie kolidowały z prawidłową równowagą odżywiania lub wody. W przypadku gdy substancja testowa jest podawana w pożywieniu, może być stosowane stałe stężenie żywieniowe (ppm) albo stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierząt; użyta opcja musi być wyszczególniona. W przypadku substancji podawanej przez dozownik, dawka powinna być podawana każdego dnia o podobnej porze, i w razie konieczności modyfikowana co najmniej raz na tydzień, żeby utrzymać stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia. Kiedy podaje się dozownikiem dawkę przeliczoną na masę ciała, należy uwzględnić informacje dotyczące dystrybucji łożyskowej.

1.4.6. **Harmonogramy badań**

Codzienne stosowanie dawki u rodzicielskich samców i samic (P) powinno rozpocząć się po przekroczeniu od 5–9 tygodni życia. Codzienne dawkowanie u samców i samic F_1 powinno rozpocząć się po zaprzestaniu ssania; należy pamiętać, że w przypadkach podawania substancji z pożywieniem lub wodą pitną, bezpośrednia ekspozycja młodych F_1 na substancję testową może nastąpić już w okresie laktacji. U obu płci (P i F_1) dawkowanie powinno się odbywać przez co najmniej 10 tygodni przed okresem krycia. Dawkowanie należy kontynuować u obu płci przez dwutygodniowy okres krycia. Samce należy humanitarnie uśmiercić, kiedy nie są już potrzebne do oceny wpływu na rozrodczość. U rodzicielskich samic P dawkowanie powinno być kontynuowane przez okres ciąży aż do czasu zaprzestania ssania potomstwa F_1. Należy rozważyć zmodyfikowanie zasad dawkowania przy uwzględnieniu dostępnych informacji na temat substancji testowej, w tym dostępnych danych dotyczących toksyczności, pobudzania przez nią metabolizmu lub bioakumulacji. Dawka dla każdego zwierzęcia powinna opierać się zazwyczaj na najbardziej aktualnym indywidualnym określeniu masy ciała. Należy jednak zachować ostrożność, kiedy dostosowuje się dawki w ostatnim trymestrze ciąży.

Podawanie samcom i samicom P i F_1 trwa do ich uśmiercenia. Wszystkie dorosłe samce i samice P i F_1 powinny zostać humanitarnie uśmiercone, kiedy nie są już potrzebne do oceny wpływu na reprodukcję. Potomstwo F_1 nie wybrane do krycia i całe potomstwo F_2 powinno zostać humanitarnie uśmiercone po zaprzestaniu ssania.

1.4.7. **Procedura krycia**

1.4.7.1. *Krycie w pokoleniu rodzicielskim (P)*

W celu każdego krycia jedną samicę umieszcza się z jednym samcem z tego samego poziomu dawkowania (krycie 1:1) do momentu kiedy nastąpi kopulacja lub upłyną 2 tygodnie. Każdego dnia samice należy poddać badaniu na obecność spermy lub czopów nasienia w pochwie. Dzień 0 danej ciąży jest określany w chwili wykrycia spermy lub czopu nasienia w pochwie. Jeśli kojarzenie w parze nie uda się, można rozważyć krycie samic samcami o dowiedzionej płodności. W danych należy dokładnie zidentyfikować kojarzone pary. Należy unikać krycia pomiędzy rodzeństwem.

▼B

1.4.7.2. *Krycie w potomstwie F_1*

W celu otrzymania pokolenia F_2, do krycia w potomstwie F_1 należy wybrać co najmniej jednego samca i jedną samicę, po zaprzestaniu ssania, z każdego miotu do krycia innymi młodymi osobnikami z tego samego poziomu dawkowania, ale z innego miotu. Wybór młodych z każdego miotu powinien być losowy, jeżeli nie zaobserwowano znaczących różnic w ciężarze ciała pomiędzy młodymi w miocie. W przypadku zaobserwowania takich różnic należy wybrać młode najbardziej reprezentatywne dla każdego z miotów. W sposób pragmatyczny dokonuje się tego na podstawie ciężaru ciała, ale wybór na podstawie wyglądu może być właściwszy. Młode z pokolenia F_1 nie powinny być kryte zanim nie osiągną pełnej dojrzałości płciowej.

Należy ustalić przyczyny braku płodności w odniesieniu do par, które nie mają potomstwa. Powyższe może obejmować takie procedury, jak dodatkowe możliwości krycia z samcami lub samicami o dowiedzionej płodności, mikroskopowe badanie organów rozrodczych oraz badania cyklu rujowego i cyklu spermatogenezy.

1.4.7.3. *Drugie krycie*

W pewnych przypadkach, takich jak związane z terapią zmiany w wielkości miotu lub zaobserwowanie niejednoznacznych skutków w pierwszym kryciu, zaleca się powtórne krycie zwierząt dorosłych P i F_1 w celu otrzymania drugiego miotu. Jeśli uznano za konieczne uzyskanie drugiego miotu w którymś z tych pokoleń, zwierzęta powinny być kryte po raz drugi po upływie około tygodnia od zaprzestania ssania przez ostatni miot.

1.4.7.4. *Wielkość miotu*

Zwierzęta są dopuszczane do miotów i wychowują swoje potomstwo do chwili zaprzestania ssania. Normalizacja wielkości miotu nie jest obowiązkowa. Kiedy dokonuje się normalizacji miotów, należy szczegółowo opisać zastosowaną metodę.

1.5. OBSERWACJE

1.5.1. **Obserwacje kliniczne**

Ogólne obserwacje kliniczne prowadzone są każdego dnia, a w przypadku dawkowania przez dozownik terminy podawania powinny uwzględniać szczytowy okres przewidywanych objawów po dawkowaniu. Należy odnotować zmiany w zachowaniu, objawy trudnego lub długotrwałego porodu oraz wszelkie objawy toksyczności. Dodatkowe, bardziej szczegółowe badanie każdego zwierzęcia należy przeprowadzić co najmniej raz na tydzień, przy okazji ważenia zwierząt. Dwa razy dziennie, a podczas weekendów raz dziennie tam, gdzie to konieczne, wszystkie zwierzęta są obserwowane pod kątem zachorowalności i śmiertelności.

▼B

1.5.2 **Masa ciała oraz konsumpcja pożywienia/wody przez zwierzęta rodzicielskie**

Zwierzęta rodzicielskie (P i F_1) należy zważyć w pierwszym dniu dawkowania i następnie co najmniej raz na tydzień. Rodzicielskie samice (P and F_1) należy ważyć co najmniej w dniu 0, 7, 14 i 20 lub 21 ciąży, a podczas laktacji w tych samych dniach, w których ważone są mioty, oraz w dniu, w którym uśmierca się zwierzęta. Obserwacje te należy umieścić w sprawozdaniu oddzielnie dla każdego dorosłego zwierzęcia. W okresie przed kojarzeniem i podczas ciąży, należy co najmniej raz w tygodniu mierzyć konsumpcję pokarmu. Należy mierzyć konsumpcję wody co najmniej raz w tygodniu, jeżeli substancję testową podaje się w wodzie.

1.5.3 **Cykl rujowy**

Długość i normalny przebieg cyklu rujowego u samic P i F_1 oceniane są poprzez rozmazy śluzówki pochwy przed kryciem i nieobowiązkowo w okresie krycia, dopóki nie zostanie ustalone zaistnienie krycia. Przy uzyskiwaniu komórek pochwy/szyjki macicy należy uważać, żeby uniknąć uszkodzenia śluzówki i, w następstwie, wywołania ciąży rzekomej (1).

1.5.4 **Parametry nasienia**

Przy uśmiercaniu wszystkich samców P i F_1 odnotowuje się masy jąder i najądrzy i po jednym z tych narządów zachowuje do badania histopatologicznego (zob. sekcja 1.5.7, 1.5.8.1). Z podgrupy co najmniej dziesięciu samców z każdej grupy samców P i F_1, pozostałe jądra i najądrza należy użyć do liczenia, odpowiednio, spermatyd odpornych na homogenizację i rezerw nasienia w ogonach najądrzy. Od tych samych samców należy zebrać nasienie z ogonów najądrzy lub kanalików nasiennych do badania ruchliwości i morfologii plemników. Jeżeli zaobserwowano występowanie skutków związanych z terapią lub jeśli w innych badaniach dowiedziono możliwych skutków względem spermatogenezy, ocena nasienia powinna zostać przeprowadzona u wszystkich samców każdej grupy dawkowania; w innych przypadkach liczenie można ograniczyć do samców P i F_1 grupy kontrolnej i grupy najwyższego dawkowania.

Należy określić całkowite liczby odpornych na homogenizację spermatyd jądrowych i plemników z ogona najądrzy (2)(3). Rezerwy nasienia w ogonach najądrzy można wyprowadzić ze stężenia i objętości nasienia w zawiesinie wykorzystywanej do wykonania ocen jakościowych oraz liczby plemników uzyskanych przez następne zmielenie i/lub homogenizację pozostałej tkanki ogona najądrza. Liczenia należy dokonać u podgrupy samców ze wszystkich grup dawkowania bezpośrednio po uśmierceniu zwierząt, chyba że dokonano zapisów wideo lub cyfrowych, lub kiedy uśmiercone osobniki zostają zamrożone i przeanalizowane później. W tych przypadkach grupa kontrolna i grupa wysokiego poziomu dawkowania może zostać przeanalizowana najpierw. Jeżeli nie zostaną w nich stwierdzone skutki związane z terapią (np. wpływ na liczbę plemników, ich ruchliwość, lub morfologię), nie ma potrzeby analizowania innych grup dawkowania. Kiedy w grupie najwyższego dawkowania zostaną stwierdzone skutki związane z terapią, wtedy powinna również zostać oceniona grupa z niższym poziomem dawki.

▼B

Ruchliwość plemników najądrza (lub kanalika nasiennego) powinna zostać oceniona lub zarejestrowana na taśmie wideo bezpośrednio po uśmierceniu. Nasienie należy uzyskać z minimalnymi uszkodzeniami i rozcieńczone w celu przeprowadzenia analizy ruchliwości, stosując uznane metody (4). Udział procentowy poruszających się postępowo plemników powinien zostać oceniony subiektywnie lub obiektywnie. Kiedy dokonuje się wspomaganej komputerowo analizy ruchu (5)(6)(7)(8)(9)(10), wyprowadzenie postępowej ruchliwości opiera się na zdefiniowanych przez użytkownika progach średniej prędkości wzdłuż drogi oraz wskaźniku prostości lub liniowym. Jeżeli próbki rejestrowane są na taśmie wideo (11) lub obrazy rejestruje się w inny sposób w czasie sekcji, wystarczy następnie tylko analiza grup kontrolnych i wysokiego dawkowania samców P i F_1, chyba że zostaną zaobserwowane skutki związane z terapią; w tym przypadku należy przeanalizować również grupę niższego dawkowania. Jeżeli nie ma obrazu wideo lub cyfrowego, wszystkie próbki ze wszystkich grup muszą zostać przeanalizowane przy sekcji zwłok.

Należy dokonać morfologicznej oceny próbki plemników z najądrzy (lub nasieniowodu). Plemniki (co najmniej 200 na próbkę) należy badać w formie utrwalonych preparatów mokrych (12) i klasyfikować jako prawidłowe lub nieprawidłowe. Przykłady nieprawidłowości morfologicznych plemników obejmują zrośnięcie, oddzielone lub zniekształcone główki i/lub wici. Oceny dokonuje się na wybranej podgrupie samców wszystkich grup dawkowania albo bezpośrednio po uśmierceniu zwierząt albo później, opierając się na zapisie wideo lub cyfrowym. Utrwalone rozmazy mogą być również oglądane później. W tych przypadkach grupa kontrolna i grupa wysokiego poziomu dawkowania może zostać przeanalizowana najpierw. Jeżeli nie zostaną w nich stwierdzone skutki związane z terapią (np. wpływ na morfologię plemników), nie ma potrzeby analizowania innych grup dawkowania. Kiedy w grupie najwyższego dawkowania zostaną stwierdzone skutki związane z terapią, wtedy należy również przeanalizować grupy z niższym poziomem dawki.

Jeżeli którykolwiek z powyższych parametrów oceny nasienia był już wcześniej badany jako część systemowego badania toksykologicznego trwającego co najmniej 90 dni, badanie to nie musi być koniecznie powtarzane w badaniu dwupokoleniowym. Zaleca się jednak, aby próbki lub cyfrowe zapisy dotyczące nasienia pokolenia P zostały zachowane do ewentualnej późniejszej oceny, jeżeli zajdzie taka konieczność.

1.5.5. **Młode**

Każdy miot należy zbadać tak szybko po urodzeniu jak to możliwe (dzień laktacji 0), w celu ustalenia liczby i płci młodych, płodów urodzonych martwo, płodów urodzonych żywo, oraz obecności poważnych nieprawidłowości. Pożądane jest zbadanie młodych, które znaleziono martwe w dniu 0, pod kątem możliwych wad i przyczyny zgonu, i zachowanie ich. Żywe młode należy policzyć i zważyć pojedynczo w dniu urodzenia (dzień 0 laktacji) lub w dniu 1, oraz w dniach regularnego ważenia, np. w dniach 4, 7, 14 i 21 laktacji. Należy odnotować nieprawidłowości fizyczne lub w zachowaniu, zaobserwowane u matek lub młodych.

▼B

Rozwój fizyczny młodych powinien być odnotowany głównie w postaci przyrostów masy ciała. Inne parametry fizyczne (otwarcie uszu i oczu, wyrzynanie zębów, wzrost sierści) mogą dostarczyć dodatkowych informacji, ale dane te najlepiej jest oceniać w kontekście dojrzewania płciowego (np. wiek i masa w dniu otwarcia pochwy lub wyróżnicowania podziału żołędzi-napletka) (13). Badania funkcjonalne (np. aktywności motorycznej, funkcji sensorycznej, ontogenezy odruchu) u młodych pokolenia F_1 przed i po zaprzestaniu ssania, szczególnie te, które wiążą się z dojrzewaniem płciowym są zalecane, jeżeli tego rodzaju stwierdzenia nie zostały objęte innymi badaniami. U młodych F_1, które zaprzestały ssania, a są przeznaczone do krycia, należy określić wiek otwarcia pochwy i pojawienia się podziału żołędzi. Odległość między odbytem a otworem płciowym należy mierzyć w dniu 0 po urodzeniu młodych F_2, jeżeli zmiany w proporcji płci w grupie lub odchylenia w dojrzewaniu płciowym wskazują na taką konieczność.

Można nie dokonywać obserwacji funkcjonalnych w grupach, które w inny sposób wykazują wyraźne oznaki kliniczne niekorzystnych skutków (np. znaczące spadki przyrostu masy itp.). Jeżeli prowadzi się obserwacje funkcjonalne, nie należy ich dokonywać na młodych wybranych do krycia.

1.5.6 **Oglądowa sekcja zwłok**

W chwili uśmiercenia lub zgonu zwierzęcia podczas badania, wszystkie zwierzęta pokolenia rodziców (P i F_1), wszystkie młode z nieprawidłowościami zewnętrznymi lub objawami klinicznymi, jak również po jednym losowo wybranym młodym/płci/miocie, powinny zostać poddane badaniom oglądowym w celu wykrycia wszelkich strukturalnych nieprawidłowości lub zmian patologicznych, ze zwróceniem szczególnej uwagi na organy układu rozrodczego. Młode, które zostały humanitarnie uśmiercone w stanie chorobowym, oraz młode padłe, jeśli nie są zmacerowane, powinny zostać zbadane pod kątem ewentualnych wad i/lub przyczyny zgonu, i utrwalone.

Macice samic, które rodziły pierwszy raz należy zbadać w sposób nie naruszający możliwości przeprowadzenia oceny histopatologicznej na obecność i liczbę zagnieżdżonych jaj.

1.5.7. **Masy narządów**

Po uśmierceniu należy określić masę ciała oraz masy następujących narządów wszystkich zwierząt rodzicielskich P i F_1 (narządy parzyste należy ważyć oddzielnie):

— macica, jajniki,

— jądra, najądrza (całe oraz ogony),

— prostata,

— pęcherzyki nasienne wraz z gruczołami opuszkowo-cewkowymi i ich płynami oraz gruczoł krokowy (jako jedna całość),

— mózg, wątroba, nerki, śledziona, przysadka, tarczyca, nadnercza i znane organy docelowe.

Należy określić masy ciała przy uśmierceniu tych młodych F_1 i F_2, które zostały wybrane do sekcji zwłok. Należy zważyć następujące narządy z jednego losowo wybranego młodego/płci/miotu (zob. sekcja 1.5.6): mózg, śledziona i grasica.

▼B

Jeśli to możliwe, wyniki oglądowej sekcji zwłok i masy narządów powinny być oceniane w zestawieniu z innymi obserwacjami poczynionymi w innych badaniach powtarzanego dawkowania.

1.5.8. **Histopatologia**

1.5.8.1. *Zwierzęta rodzicielskie*

Należy utrwalić i przechowywać w odpowiednim środku następujące narządy i tkanki zwierząt rodzicielskich (P i F_1) lub ich reprezentatywne próbki do badania histopatologicznego:

— pochwa, macica z szyjką oraz jajniki (zachowane w odpowiednim utrwalaczu),

— jedno jądro (zachowane w utrwalaczu Bouina lub porównywalnym), jedno najądrze, kanaliki nasienne, gruczoł krokowy i gruczoł opuszkowo-cewkowy,

— wcześniej określony organ (organy) docelowe ze wszystkich zwierząt P i F_1 wybranych do kojarzenia.

Należy wykonać pełne badanie histopatologiczne wyliczonych powyżej utrwalonych narządów i tkanek u wszystkich zwierząt grupy wysokiego dawkowania i zwierząt kontrolnych P i F_1 wybranych do kojarzenia. Badanie jajników zwierząt P nie jest obowiązkowe. W grupach najmniejszego i pośredniego dawkowania należy również zbadać narządy wykazujące zmiany związane z terapią, by pomóc w wyjaśnieniu NOAEL. Ponadto należy poddać ocenie histopatologicznej organy rozrodcze zwierząt z grup najniższego i pośredniego poziomu dawkowania, podejrzanych o obniżoną płodność, tj. zwierząt, które nie kojarzyły się, nie zostały zapłodnione, nie spłodziły, albo nie urodziły zdrowego potomstwa. Należy zbadać wszystkie duże zmiany, jak atrofia lub guzy.

Należy przeprowadzić szczegółowe badania histopatologiczne jąder (np. z wykorzystaniem utrwalacza Bouina, zatapiania w parafinie i skrawania poprzecznych skrawków o grubości 4–5 μm) w celu określenia związanych z terapią skutków, takich jak zatrzymane spermatydy, braki komórek warstw zarodkowych lub ich typów, wielojądrowe komórki olbrzymie lub oddzielanie się komórek spermatogennych w światło przewodu (14). Badanie nienaruszonego najądrza powinno obejmować głowę, trzon i ogon, co można osiągnąć przez ocenę przekroju poprzecznego. Badanie najądrza powinno obejmować naciekanie leukocytami, zmiany w występowaniu poszczególnych typów komórek, typy komórek odbiegających od normy i fagocytozę plemników. W ocenie męskich narządów rozrodczych należy stosować barwienie metodą PAS i hematoksyliną.

Jajnik polaktacyjny powinien zawierać pęcherzyki rdzenne i pęcherzyki wzrastające, jak również duże ciałka żółte okresu laktacji. Badanie histopatologiczne powinno wykryć jakościowe upośledzenie populacji pęcherzyków rdzennych. U samic F_1 należy przeprowadzić ilościową ocenę pęcherzyków rdzennych; liczba zwierząt, wybór przekrojów jajnika i wielkość próby przekrojów powinny mieć wielkości spełniające wymagania używanej procedury oceny statystycznej. Badanie powinno zawierać liczenie liczby pęcherzyków rdzennych, którą dla potrzeb porównania jajników zwierząt badanych i kontrolnych można połączyć z liczbą małych pęcherzyków wzrastających (15)(16)(17)(18)(19).

▼B

1.5.8.2. *Młode po zaprzestaniu ssania*

Tkanki i narządy docelowe ze znacznymi nieprawidłowościami ze wszystkich młodych z zewnętrznymi nieprawidłowościami lub oznakami klinicznymi, jak również z jednego losowo wybranego młodego/płci/miotu z pokoleń F_1 i F_2 nieprzeznaczonego do krycia, należy utrwalić i przechować w odpowiednim środku, do badań histopatologicznych. Należy określić pełną histopatologiczną charakterystykę utrwalonej tkanki ze szczególnym uwzględnieniem narządów rozrodczych.

2. **DANE**

2.1. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Dane należy podawać indywidualnie i podsumować w formie tabeli wykazującej, w odniesieniu do każdej grupy badanej i każdego pokolenia, liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które znaleziono martwe podczas badania lub zwierząt uśmierconych ze względów humanitarnych, czas śmierci lub humanitarnego uśmiercenia, liczbę zwierząt płodnych, liczbę ciężarnych samic, liczbę zwierząt wykazujących zaobserwowane oznaki toksyczności, z podaniem czasu ich pojawienia się, w tym czasu trwania, ciężkości wszelkich skutków toksyczności, rodzajów obserwacji zwierząt rodzicielskich i potomstwa, rodzajów zmian histopatologicznych oraz wszelkich odnośnych danych miotów.

Wyniki liczbowe należy ocenić właściwą, uznaną metodą statystyczną; wyboru metod statystycznych należy dokonać w ramach projektowania badania i uzasadnić. Użytecznym w analizie może być model statystyczny zależności reakcji od dawki. Sprawozdanie powinno zawierać wystarczające informacje dotyczące użytych metod analizy i oprogramowania komputerowego, tak aby niezależny recenzent/statystyk mógł dokonać powtórnej oceny i odtworzyć analizę.

2.2. OCENA WYNIKÓW

Wyniki uzyskane w dwupokoleniowym badaniu toksyczności reprodukcyjnej należy ocenić w kategoriach zaobserwowanych skutków, w tym ustaleń z sekcji zwłok i badań mikroskopowych. Ocena obejmuje stwierdzenie zależności – lub jej braku – pomiędzy dawką substancji testowej a obecnością lub brakiem, częstością i ciężkością nieprawidłowości, wliczając w to poważne zmiany, wskazane organy docelowe, zmienioną płodność, nieprawidłowości kliniczne, zmienione funkcje rozrodcze i funkcjonowanie miotów, zmiany masy ciała, wpływ na śmiertelność i wszelkie inne skutki toksyczne.

W ocenie wyników należy uwzględnić własności fizykochemiczne substancji testowej i (w miarę dostępności) dane toksykokinetyczne. Prawidłowo przeprowadzone badanie toksyczności reprodukcyjnej powinno dostarczyć zadowalającą ocenę poziomu niepowodującego skutków oraz dać możliwość lepszego zrozumienia niekorzystnych skutków wywieranych na reprodukcję, poród, laktację i rozwój pourodzeniowy, w tym wzrost i dojrzewanie płciowe.

▼B

2.3. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Dwupokoleniowy test toksyczności reprodukcyjnej dostarcza informacji o skutkach powtarzanej ekspozycji na substancję, podczas wszystkich faz cyklu rozrodczego. W szczególności badanie to dostarcza informacji o parametrach rozrodu, a także o rozwoju, wzroście, dojrzewaniu i przeżywaniu młodych. Wyniki tego badania należy rozpatrywać w połączeniu z wynikami uzyskanymi w badaniach toksyczności podchronicznej, przedurodzeniowej toksyczności rozwojowej i badaniach toksykokinetycznych i innych dostępnych badaniach. Wyniki tego badania mogą być wykorzystane do oceny potrzeby dalszego badania substancji chemicznej. Ekstrapolacja wyników tego badania na człowieka jest uprawniona tylko w ograniczonym stopniu. Najlepszym sposobem ich wykorzystania jest dostarczanie informacji dotyczącej poziomów niepowodujących skutków i dopuszczalnej ekspozycji ludzi (20)(21)(22)(23).

3. **SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań musi zawierać następujące szczegółowe informacje:

Substancja testowa:

— cechy fizyczne, oraz, w odpowiednich przypadkach, własności fizykochemiczne,

— dane identyfikacyjne,

— czystość.

Nośnik (w stosownych przypadkach):

— uzasadnienie wyboru nośnika, jeśli jest inny niż woda.

Zwierzęta badane:

— użyty gatunek/szczep,

— liczba, wiek i płeć zwierząt,

— źródło, warunki środowiska, pożywienie, materiał gniazdowy itp.,

— indywidualna masa ciała zwierząt na początku badania.

Warunki badania:

— racjonalne uzasadnienie doboru poziomu dawek,

— szczegóły formy użytkowej substancji testowej/przygotowywania pożywienia, osiągnięte stężenia,

— stabilność i jednorodność preparatu,

— szczegóły dotyczące podawania substancji testowej,

— w stosownych przypadkach przeliczenie stężeń substancji testowej w pożywieniu/wodzie pitnej (ppm) na dawkę rzeczywistą (mg/kg masy ciała/dzień),

— szczegóły dotyczące jakości pożywienia i wody pitnej.

▼B

Wyniki:

— konsumpcja pokarmu, konsumpcja wody (jeżeli dane są dostępne), wydajność wykorzystania pokarmu (przyrost masy ciała na gram zjadanego pokarmu), konsumpcja materiału badanego u zwierząt P i F_1, z wyjątkiem okresu wspólnego przebywania w klatce i ostatniej jednej trzeciej okresu laktacji;

— dane dotyczące absorpcji (jeżeli są dostępne),

— dane dotyczące mas ciała zwierząt P i F1 przeznaczonych do krycia,

— dane dotyczące mas miotów i młodych,

— masy ciała w chwili uśmiercenia oraz bezwzględne i względne masy narządów u zwierząt rodzicielskich,

— rodzaj, ciężkość i czas trwania obserwowanych objawów klinicznych (tak odwracalnych jak i nieodwracalnych),

— data śmierci podczas doświadczenia lub informacja, że zwierzęta przeżyły do uśmiercenia,

— dane dotyczące reakcji toksycznej w rozbiciu na płeć i dawkę, w tym wskaźniki krycia, płodności, ciąż, urodzeń, żywotności oraz laktacji; sprawozdanie powinno podawać liczby wykorzystane do obliczania tych wskaźników,

— skutki toksyczne lub inne wywierane na reprodukcję, potomstwo, wzrost pourodzeniowy itp.,

— stwierdzenia w czasie sekcji,

— szczegółowy opis stwierdzeń histopatologicznych,

— liczba samic P i F_1 z normalnym cyklem oraz długość cyklu,

— całkowita liczba plemników ogona najądrza, procent progresywnie przemieszczających się plemników, procent morfologicznie normalnych plemników oraz procenty plemników z każdą określoną nieprawidłowością,

— czas do krycia, w tym liczba dni do momentu krycia,

— długość trwania ciąży,

— liczba zagnieżdżonych płodów, ciałek żółtych, wielkość miotu,

— liczba młodych urodzonych żywo i strat poimplantacyjnych,

— liczba młodych z widocznymi znacznymi nieprawidłowościami, liczba słabowitych młodych w miocie, jeżeli została określona, powinna zostać podana w sprawozdaniu,

— dane o fizycznych punktach charakterystycznych u młodych i inne dane na temat rozwoju pourodzeniowego; ocenione punkty charakterystyczne należy uzasadnić,

— w stosownych przypadkach, dane z obserwacji funkcjonalnych u młodych i dorosłych,

— w stosownych przypadkach, statystyczne opracowanie wyników.

▼B

Dyskusja wyników.

Wnioski, w tym wartości NOAEL dla skutków u matek i potomstwa.

4 **BIBLIOGRAFIA**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, 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: 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: 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): 237–244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267–273.

(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: 409–421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5: 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, pp. 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: 401–415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8: 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: 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: 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, pp. 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 5:379–383.

(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. **TOKSYKOKINETYKA**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczą OECD nr 417 (2010). Badania toksykokinetyki badanej substancji chemicznej prowadzone są w celu uzyskania odpowiednich informacji na temat wchłaniania, dystrybucji, biotransformacji (tj. metabolizmu) i wydalania tej substancji, a także aby pomóc w powiązaniu stężenia lub dawki z obserwowaną toksycznością oraz w zrozumieniu mechanizmu toksyczności danej substancji. Toksykokinetyka może pomóc w zrozumieniu badań toksykologicznych poprzez wykazanie, że zwierzęta doświadczalne są systematycznie narażane na działanie badanej substancji chemicznej, oraz ujawnienie krążących grup funkcyjnych (macierzystej substancji chemicznej/metabolitów). Podstawowe parametry toksykokinetyczne określone na podstawie tych badań dostarczą również informacji na temat potencjału akumulacji badanej substancji chemicznej w tkankach lub narządach oraz potencjału indukcji biotransformacji w wyniku narażenia na badaną substancję chemiczną.

2. Dane toksykokinetyczne mogą pomóc w ocenie adekwatności i znaczenia danych dotyczących toksyczności dla zwierząt na potrzeby ekstrapolacji na zagrożenie dla ludzi lub oceny ryzyka. Dodatkowo badania toksykokinetyczne mogą dostarczyć przydatnych informacji dla celów określenia poziomów dawkowania w badaniach toksyczności (kinetyka liniowa w porównaniu z kinetyką nieliniową), skutków drogi podania, biodostępności oraz zagadnień związanych z projektem badania. Określone typy danych toksykokinetycznych można wykorzystać do opracowania fizjologicznego modelu toksykokinetycznego (PBTK).

3. Istnieją ważne zastosowania dla danych dotyczących metabolitów/toksykokinetyki, takie jak wskazywanie możliwej toksyczności i charakteru działania oraz ich związku z poziomem dawkowania i drogą narażenia. Ponadto dane dotyczące metabolizmu mogą dostarczyć informacji przydatnych do oceny toksykologicznego znaczenia narażenia na egzogennnie wytwarzane metabolity badanej substancji chemicznej.

4. Wystarczające dane toksykokinetyczne posłużą jako poparcie dalszej dopuszczalności i zastosowania ilościowych zależności struktura-aktywność, podejścia przekrojowego lub podejścia polegającego na grupowaniu w ramach oceny bezpieczeństwa chemikaliów. Dane kinetyczne można również wykorzystać do oceny znaczenia toksykologicznego innych badań (np. *in vivo*/*in vitro*).

5. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do podawania badanej substancji chemicznej drogą pokarmową, chyba że wymienia się inną drogę podawania (zob. zwłaszcza pkt 74–78).

WSTĘPNE ROZWAŻANIA

6. W systemach regulacji istnieją różne wymogi i potrzeby związane z pomiarem punktów końcowych i parametrów związanych z toksykokinetyką dla różnych klas substancji chemicznych (np. pestycydów, produktów biobójczych, chemikaliów przemysłowych). W przeciwieństwie do większości metod badawczych w niniejszej metodzie opisano badanie toksykokinetyczne, które obejmuje wiele pomiarów i punktów końcowych. W przyszłości może dojść do opracowania kilku nowych metod badawczych lub wytycznych, aby opisać każdy punkt końcowy odrębnie i w sposób bardziej szczegółowy. W przypadku niniejszej metody badawczej to, które badania lub oceny są przeprowadzane, jest określone zgodnie z wymogami lub potrzebami każdego systemu regulacji.

▼M4

7. Istnieje wiele badań, które można przeprowadzić, aby ocenić zachowanie toksykokinetyczne badanej substancji chemicznej dla celów regulacyjnych. Niemniej jednak w zależności od określonych potrzeb regulacyjnych lub sytuacji nie wszystkie z tych możliwych badań mogą być konieczne dla oceny badanej substancji chemicznej. Projekt badań toksykokionetycznych wymaga elastyczności i uwzględnienia cech badanej substancji chemicznej będących przedmiotem zainteresowania. W niektórych przypadkach konieczne może być tylko rozpatrzenie określonego zestawu pytań, aby uwzględnić zagrożenie i ryzyko związane z badaną substancją chemiczną. W niektórych sytuacjach dane toksykokinetyczne można zgromadzić w ramach oceny w innych badaniach toksykologicznych. W innych przypadkach konieczne mogą być dodatkowe lub bardziej rozległe badania toksykokinetyczne, zależnie od potrzeb regulacyjnych lub jeżeli w trakcje oceny badanej substancji chemicznej pojawią się nowe pytania.

8. Przed przeprowadzeniem badania laboratorium badawcze powinno wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej oraz jej istotnych metabolitów i analogów w celu poprawienia jakości badania oraz uniknięcia niepotrzebnego wykorzystania zwierząt. Może to obejmować dane pochodzące z innych właściwych metod badawczych (badań *in vivo*, *in vitro* lub ocen *in silico*). Właściwości fizykochemiczne, takie jak: współczynnik podziału oktanol/woda (wyrażony jako log P_{OW}), pKa, rozpuszczalność w wodzie, prężność pary, masa cząsteczkowa substancji chemicznej, mogą być przydatne przy planowaniu badania i interpretacji wyników. Można je ustalić za pomocą odpowiednich metod opisanych w stosownych metodach badawczych.

OGRANICZENIA

9. Niniejsza metoda badawcza nie została opracowana do zastosowania w szczególnych okolicznościach, takich jak u zwierząt ciężarnych lub w okresie laktacji oraz u potomstwa, ani do oceny potencjalnych pozostałości u zwierząt narażonych na działanie substancji, od których lub z których pozyskuje się żywność. Dane uzyskane z badania B.36 mogą jednak zapewnić podstawowe informacje na potrzeby zaprojektowania konkretnych badań do takich celów. Niniejsza metoda badawcza nie jest przeznaczona do badania nanomateriałów. Sprawozdanie ze wstępnego przeglądu wytycznych OECD dotyczących badań w zakresie ich zastosowania do nanomateriałów wskazuje na to, że TG 417 (równoważna niniejszej metodzie badawczej B.36) może nie mieć zastosowania do nanomateriałów (1).

DEFINICJE

10. Definicje stosowane dla celów niniejszej metody badawczej przedstawiono w dodatku.

TROSKA O DOBROSTAN ZWIERZĄT

11. Wytyczne dotyczące humanitarnego traktowania zwierząt są dostępne w wytycznej OECD (GD) nr 19 (2). Zaleca się, aby we wszystkich badaniach *in vivo* i *in vitro* opisanych w niniejszej metodzie badawczej korzystać z wytycznej OECD GD nr 19.

OPIS METOD

Badania pilotażowe

12. Zaleca i poleca się korzystanie z badań pilotażowych na potrzeby wyboru parametrów doświadczalnych dla badań toksykokinetycznych (np. metabolizmu, bilansu masy, procedur analitycznych, zakresu dawkowania, wydychania CO_2 itd.). Opis niektórych z tych parametrów może nie wymagać użycia substancji chemicznych znakowanych izotopowo.

▼M4

Wybór zwierząt

Gatunek

13. Gatunek zwierzęcia (i szczep) wykorzystywany w badaniu toksykokinetycznym powinien być taki sam jak gatunek wykorzystany w innych badaniach toksykologicznych przeprowadzonych nad daną badaną substancją chemiczną. Zazwyczaj wykorzystywanym gatunkiem powinien być szczur, gdyż jest to gatunek szeroko wykorzystywany do badań toksykologicznych. Wykorzystanie innych lub dodatkowych gatunków może być uzasadnione, jeżeli kluczowe badania toksykologiczne wskazują na oznaki znacznej toksyczności u tych gatunków lub jeżeli wykazano, że ich toksyczność/toksykokinetyka ma większe znaczenie dla ludzi. Należy podać uzasadnienie wyboru gatunku i szczepu zwierząt.

14. O ile nie wspomniano inaczej, w niniejszej metodzie badawczej szczura określa się gatunkiem badanym. W celu wykorzystania innych badanych gatunków konieczna może być modyfikacja pewnych aspektów tej metody.

Wiek i szczep

15. Zaleca się wykorzystanie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt (zazwyczaj w wieku 6–12 tygodni w chwili dawkowania; zob. też pkt 13 i 14). W przypadku wykorzystywania zwierząt innych niż młode dorosłe osobniki należy podać uzasadnienie. Na początku badania wszystkie zwierzęta powinny być w podobnym wieku. Odchylenie masy poszczególnych zwierząt nie powinno przekraczać ± 20 % średniej masy badanej grupy. Najlepiej byłoby, gdyby wykorzystywany szczep był taki sam jak szczep wykorzystany do otrzymania bazy danych toksykologicznych dotyczących badanej substancji chemicznej.

Liczba i płeć zwierząt

16. Dla każdej zbadanej dawki należy wykorzystać przynajmniej cztery zwierzęta jednej płci. Płeć wykorzystanych zwierząt należy uzasadnić. Należy rozważyć wykorzystanie obu płci (czterech samców i czterech samic), jeżeli istnieją dowody potwierdzające znaczne różnice w toksyczności związane z płcią.

Warunki przetrzymywania i karmienia

17. W okresie badania zwierzęta na ogół należy przetrzymywać oddzielnie. Przetrzymywanie w grupach może być uzasadnione w szczególnych okolicznościach. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 h światła, 12 h ciemności. Temperatura w pomieszczeniach dla zwierząt doświadczalnych powinna wynosić 22 °C (± 3 °C), a względna wilgotność 30–70 %. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej.

Badana substancja chemiczna

18. Znakowana izotopowo badana substancja chemiczna z wykorzystaniem węgla ^{14}C powinna być stosowana we wszystkich aspektach badania związanych z bilansem masy i identyfikacją metabolitów; jeżeli jednak można wykazać, że:

— bilans masy i identyfikację metabolitów można odpowiednio ocenić za pomocą badanej substancji chemicznej nieznakowanej izotopowo,

— swoistość i czułość analityczna metody stosowanej wraz z niepromieniotwórczą badaną substancją chemiczną są równe tym, które można uzyskać przy użyciu badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo, lub wyższe,

▼M4

wówczas nie trzeba stosować znakowanej izotopowo badanej substancji chemicznej. Ponadto można stosować inne promieniotwórcze stabilne izotopy, w szczególności jeśli dany pierwiastek w całości lub częściowo odpowiada za toksyczność badanej substancji chemicznej. Jeżeli to możliwe, znakowanie izotopowe powinno znajdować się w centralnej części cząsteczki, która jest metabolicznie stabilna (nie podlega wymianie, nie jest usuwana metabolicznie jako CO_2 i nie staje się częścią puli fragmentów jednowęglowych organizmu). Znakowanie wielu miejsc lub określonych regionów cząsteczki może być niezbędne do śledzenia przebiegu metabolizmu badanej substancji chemicznej.

19. Znakowane i nieznakowane izotopowo badane substancje chemiczne należy analizować za pomocą odpowiednich metod, aby określić czystość i tożsamość. Czystość radiochemiczna badanej promieniotwórczej substancji chemicznej powinna być możliwie najwyższa z możliwych dla danej substancji (w idealnych warunkach powinna być wyższa niż 95 %). Należy dołożyć rozsądnych starań, aby zidentyfikować zanieczyszczenia obecne na poziomie 2 % lub wyższym. Należy podać czystość wraz z tożsamością i odsetkiem wszelkich zidentyfikowanych zanieczyszczeń. W poszczególnych programach regulacji przewidziane może być zapewnienie dodatkowych wytycznych pomocnych w definiowaniu i specyfikacji badanych substancji chemicznych złożonych z mieszanin, a także metod ustalania czystości.

Wybór dawki

Badanie pilotażowe

20. Zazwyczaj do badania pilotażowego wystarczy pojedyncza dawka doustna. Dawka ta powinna być nietoksyczna, lecz wystarczająco wysoka, aby umożliwić identyfikację metabolitów w wydalinach (i w stosownych przypadkach w osoczu), jak również spełniać określony cel badania pilotażowego, o którym mowa w pkt 12 niniejszej metody badawczej.

Badania główne

21. W przypadku badań głównych preferowane są co najmniej dwie dawki, ponieważ informacje zebrane z przynajmniej dwóch grup otrzymujących dawki mogą pomóc w określeniu dawek w innych badaniach toksyczności oraz pomóc w ocenie dawka-odpowiedź w ramach już dostępnych badań toksyczności.

22. W przypadku podawania dwóch dawek obie dawki powinny być wystarczająco wysokie, aby umożliwić identyfikację metabolitów w wydalinach (i w stosownych przypadkach w osoczu). Przy wyborze dawki należy uwzględnić informacje pochodzące z dostępnych danych dotyczących toksyczności. Jeżeli informacje takie nie są dostępne (np. pochodzące z badań toksyczności ostrej doustnej, w których odnotowano kliniczne oznaki toksyczności, lub z badań toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem), można rozważyć taką wartość wyższej dawki, która jest niższa od szacowanej wartości LD_{50} (droga doustna i droga dermalna) lub LC_{50} (droga inhalacyjna) lub niższa od niższej wartości szacowanego przedziału toksyczności ostrej. Niższa dawka powinna stanowić pewien ułamek wyższej dawki.

23. W przypadku badania wyłącznie jednego poziomu dawkowania najlepiej byłoby, gdyby dawka była wystarczająco wysoka, aby umożliwić identyfikację metabolitów w wydalinach (i w stosownych przypadkach w osoczu), jednocześnie nie wywołując widocznej toksyczności. Jeżeli drugiego poziomu dawkowania nie uwzględniono, należy to uzasadnić.

24. Jeżeli istnieje potrzeba ustalenia skutków dawki dla procesów kinetycznych, dwie dawki mogą być niewystarczające i przynajmniej jedna dawka powinna być wystarczająco duża, aby nasycić te procesy. Jeżeli pole pod krzywą (AUC) stężenia w osoczu w czasie między dwiema dawkami wykorzystanymi w badaniu głównym nie jest liniowe, jest to silna przesłanka, że gdzieś pomiędzy tymi dwoma poziomami dawkowania występuje nasycenie jednego procesu kinetycznego lub większej ich liczby.

▼M4

25. W przypadku badanych substancji chemicznych o niskiej toksyczności należy zastosować maksymalną dawkę 1 000 mg/kg masy ciała (droga doustna i droga dermalna; podawanie drogą inhalacyjną - zob. rozdział B.2 niniejszego załącznika; zazwyczaj dawka ta nie przekracza 2 mg/l). Okoliczności specyficzne dla danej substancji chemicznej mogą wymagać zastosowania większej dawki w zależności od potrzeb regulacyjnych. Wybór dawki zawsze należy uzasadnić.

26. Toksykokinetyka pojedynczej dawki i dane dotyczące dystrybucji w tkankach mogą być wystarczające do określenia potencjału akumulacji lub trwałości. W pewnych okolicznościach potrzebne jednak może być podanie powtarzane (i) aby w bardziej kompletny sposób zbadać potencjał akumulacji lub trwałości bądź zmiany w toksykokinetyce (tj. na przykład w indukcji i inhibicji enzymatycznej); lub (ii) zgodnie z wymogami mającego zastosowanie systemu regulacji. W badaniach z zastosowaniem powtarzanego dawkowania w pewnych okolicznościach również konieczne może być powtarzane podanie dużej dawki, chociaż zazwyczaj wystarcza powtarzane podanie małej dawki (zob. także pkt 57).

Podawanie badanej substancji chemicznej

27. Badaną substancję chemiczną należy rozpuścić lub sporządzić jednorodną zawiesinę w tym samym nośniku, który wykorzystano w innych badaniach toksyczności doustnej dotyczących podawania danej badanej substancji chemicznej za pomocą sondy, jeżeli takie informacje na temat nośnika są dostępne. Należy przedstawić uzasadnienie wyboru nośnika. Wybór nośnika i objętość dawki należy uwzględnić w projekcie badania. Zwyczajową metodą podawania jest podawanie przez sondę, jednak podawanie substancji w kapsułkach żelatynowych lub zmieszanej z pokarmem może być w określonych sytuacji korzystniejsze (w obu przypadkach należy przedstawić uzasadnienie). Należy zapewnić weryfikację rzeczywistej dawki podanej każdemu zwierzęciu.

28. Maksymalna objętość cieczy, jaką można podać jednorazowo za pomocą sondy, zależy od wielkości badanego zwierzęcia, rodzaju nośnika oraz tego, czy przed podaniem badanej substancji chemicznej wstrzymuje się podawanie pokarmu. Należy przedstawić uzasadnienie podawania lub ograniczenia podawania pokarmu przed podaniem dawki. Zwykle objętość powinna być utrzymywana na możliwie niskim poziomie, jaki jest praktyczny dla nośników wodnych lub bezwodnych. Objętość dawki zazwyczaj nie powinna przekraczać 10 ml/kg masy ciała w przypadku gryzoni. Objętość nośników stosowanych w przypadku bardziej lipofilnych badanych substancji chemicznych może rozpoczynać się od 4 ml/kg masy ciała. W odniesieniu do powtarzanego dawkowania, gdzie codzienne wstrzymywanie podawania pokarmu byłoby niewskazane, należy rozważyć mniejszą objętość dawki (np. 2-4 ml/kg masy ciała). W miarę możliwości można rozważyć zastosowanie objętości dawki zgodnej z dawką badanej substancji chemicznej podawaną drogą pokarmową przez sondę w ramach innych badań.

29. Podawanie dożylne badanej substancji chemicznej i pomiar tej substancji we krwi lub w wydalinach można wykorzystać do ustalenia biodostępności lub względnego wchłaniania po podaniu doustnym. W przypadku badania po podaniu dożylnym podaje się pojedynczą dawkę (zwykle odpowiadającą mniejszej dawce podawanej drogą doustną, lecz jej nieprzekraczającej – zob. wybór dawki) badanej substancji chemicznej z zastosowaniem odpowiedniego nośnika. Materiał ten należy podawać w odpowiedniej objętości (np. 1 ml/kg masy ciała) w wybranym miejscu podania co najmniej czterem zwierzętom odpowiedniej płci (jeśli jest to uzasadnione, można wykorzystać obie płci, zob. pkt 16). W przypadku dożylnego podania badanej substancji chemicznej konieczne jest przygotowanie w pełni rozpuszczonej dawki lub

▼M4

zawiesiny. Nośnik dla podania dożylnego nie powinien zakłócać integralności ani przepływu krwi. Jeśli badana substancja chemiczna podawana jest we wlewie, szybkość wlewu powinna być podana i ujednolicona pomiędzy zwierzętami, pod warunkiem że stosowana jest pompa infuzyjna. Należy zastosować znieczulenie w przypadku wprowadzania kaniuli do żyły szyjnej (w celu podania badanej substancji chemicznej lub pobrania krwi) lub jeżeli do podania wykorzystuje się tętnicę udową. Należy rozważyć rodzaj znieczulenia, ponieważ może mieć on wpływ na toksykokinetykę. Przed podaniem badanej substancji chemicznej wraz z nośnikiem zwierzętom należy umożliwić odpowiednią regenerację.

30. W przypadku konkretnych badanych substancji chemicznych zastosowanie mogą mieć inne drogi podania, takie jak droga dermalna i inhalacyjna (zob. pkt 74-78), biorąc pod uwagę cechy fizykochemiczne tych substancji i spodziewane zastosowanie przez człowieka lub narażenie ludzi.

Pomiary

Bilans masy

31. Bilans masy określa się poprzez zsumowanie odsetka podanej (promieniotwórczej) dawki wydalonej w moczu, kale i wydychanym powietrzu oraz odsetka obecnego w tkankach, reszcie ciała i materiale wypłukanym z klatki (zob. pkt 46). Na ogół całkowity odzysk podanej badanej substancji chemicznej (promieniotwórczej) rzędu > 90 % uważa się za wystarczający.

Wchłanianie

32. Wstępne oszacowanie absorpcji można uzyskać poprzez wyłączenie odsetka dawki w przewodzie pokarmowym lub w kale z pomiaru bilansu masy. Obliczanie odsetka wchłaniania – zob. pkt 33. Badanie wydalin – zob. pkt 44–49. Jeżeli dokładnego stopnia wchłaniania po podaniu dawki drogą doustną nie można określić na podstawie badań bilansu masy (np. jeżeli więcej niż 20 % podanej dawki występuje w kale), konieczne mogą być dalsze badania. Badania te mogą obejmować albo 1) podanie badanej substancji chemicznej drogą doustną i pomiar tej substancji w żółci; albo 2) podanie badanej substancji chemicznej drogą doustną i dożylną oraz pomiar badanej substancji chemicznej netto w moczu, wydychanym powietrzu i ciele dla każdej z obu tych dróg podania. W obu projektach badania pomiar promieniotwórczości wykonuje się jako zastępczą metodę swoistej analizy chemicznej badanej substancji chemicznej i metabolitów.

33. W przypadku przeprowadzania badania wydalania z żółcią zazwyczaj stosuje się doustną drogę podawania. W badaniu tym wprowadza się kaniulę do przewodów żółciowych co najmniej czterech zwierząt odpowiedniej płci (lub w uzasadnionych przypadkach obu płci) i podaje pojedynczą dawkę badanej substancji chemicznej. Po podaniu tej substancji wydalanie promieniotwórczości/badanej substancji chemicznej w żółci należy monitorować tak długo, jak będzie to konieczne do oszacowania odsetka podanej dawki, która jest wydalana tą drogą, co można wykorzystać do bezpośredniego obliczenia stopnia wchłaniania po podaniu doustnym w następujący sposób:

$$\text{Wartość procentowa wchłaniania} = \begin{array}{l}(\text{ilość wżółci} + \text{moczu} + \text{wydychanym} \\ \text{powietrzu} + \text{ciele bez zawartości przewodu} \\ \text{pokarmowego})/\text{podana ilość} \times 100\end{array}$$

34. W przypadku niektórych klas badanych substancji chemicznych może wystąpić bezpośrednie wydzielanie wchłoniętej dawki przez błony jelitowe. W takiej sytuacji pomiaru % dawki w kale po doustnym podaniu dawki kaniulą wprowadzoną w drogi żółciowe szczura nie uważa się za wartość reprezentatywną dla niewchłoniętej dawki. Zaleca się, aby w przypadkach, w których sądzi się, że zachodzi wydzielanie jelitowe, % wchłoniętej dawki opierał się na wchłanianiu obliczonym poprzez porównanie wydalania po podaniu dawki drogą doustną i drogą dożylną (szczur nienaruszony lub z kaniulą wprowadzoną w drogi żółciowe) (zob. pkt 35). Zaleca się również, aby w przypadku, gdy oznaczanie ilościowe wydzielania jelitowego uważa się za konieczne, mierzone były wydaliny u szczura z kaniulą wprowadzoną w drogi żółciowe po podaniu dawki drogą dożylną.

▼M4

Biodostępność

35. Biodostępność można określić na podstawie kinetyki osocza/krwi w odniesieniu do grup, które daną substancję otrzymują drogą doustną i dożylną, jak opisano w pkt 50-52, poprzez specyficzną analizę chemiczną badanej substancji lub istotnych metabolitów, a tym samym nie wymaga to stosowania badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo. Biodostępność (F) badanej substancji chemicznej lub istotnych metabolitów można zatem obliczyć w następujący sposób:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (dawka_{IV}/dawka_{exp})$$

gdzie AUC jest polem pod krzywą stężenia w osoczu w czasie, a exp jest doświadczalną drogą podania (doustną, dermalną lub inhalacyjną).

36. Dla celów zastosowania w ocenie ryzyka skutków ogólnoustrojowych biodostępność składnika toksycznego jest na ogół preferowana nad odsetek wchłaniania, gdy porównuje się stężenia ogólnoustrojowe pochodzące z badań na zwierzętach z analogicznymi danymi z biomonitoringu uzyskanymi z badań narażenia pracowników. Sytuacja może stać się bardziej złożona, jeżeli dawki znajdują się w zakresie nieliniowym, dlatego ważne jest, aby w przesiewowych badaniach toksykokinetycznych dawki określać w zakresie liniowym.

Dystrybucja w tkankach

37. Wiedza o dystrybucji badanej substancji chemicznej lub jej metabolitów w tkankach jest ważna dla identyfikacji tkanek docelowych, a także dla zrozumienia podstawowych mechanizmów toksyczności oraz dla uzyskania informacji dotyczących potencjału akumulacji i trwałości badanej substancji chemicznej i metabolitów. Odsetek całkowitej (promieniotwórczej) dawki w tkankach i w reszcie ciała należy zbadać przynajmniej na zakończenie doświadczenia związanego z wydalaniem (tzn. zazwyczaj do 7 dni po podaniu dawki lub wcześniej, w zależności od zachowania badanej substancji chemicznej). W przypadku niewykrycia badanej substancji chemicznej w tkankach w chwili zakończenia badania (np. ponieważ z powodu krótkiego okresu półtrwania badana substancja mogła zostać usunięta przed zakończeniem badania) należy zachować ostrożność, aby zapobiec błędnej interpretacji danych. W tego typu sytuacji dystrybucję w tkankach należy zbadać w chwili, gdy stężenie badanej substancji chemicznej (lub metabolitu) osiąga odpowiednio szczytowe stężenie w krwi/osoczu (T_{max}) lub szczytowy poziom wydzielania z moczem (zob. pkt 38). Ponadto pobieranie tkanek w dodatkowych punktach czasowych może być konieczne dla określenia dystrybucji badanej substancji chemicznej lub jej metabolitów w tkankach, ocenienia (w stosownych przypadkach) zależności od czasu, pomocniczo dla określenia bilansu masy lub wymagane przez właściwy organ. Do tkanek, które należy pobrać, należą: wątroba, tłuszcz, przewód pokarmowy, nerka, śledziona, krew pełna, reszta ciała, tkanki organu docelowego i wszelkie inne tkanki (np. tarczyca, erytrocyty, organy rozrodcze, skóra, oko (szczególnie u zwierząt zabarwionych)) mające potencjalne znaczenie przy toksykologicznej ocenie badanej substancji chemicznej. Należy rozważyć analizę dodatkowych tkanek w tych samych punktach czasowych, aby zmaksymalizować wykorzystanie zwierząt, i w przypadku gdy toksyczność dla organu docelowego obserwuje się w badaniach toksyczności podprzewlekłej lub przewlekłej. Należy również podać stężenie rezydualne (promieniotwórczość) i współczynniki podziału tkanki/osocze (krew).

38. Ocena dystrybucji w tkankach w dodatkowych punktach czasowych, takich jak moment szczytowego stężenia w osoczu/krwi (np. T_{max}) lub szczytowego poziomu wydzielania z moczem, uzyskana z odpowiednich badań kinetyki osocza/krwi lub wydalin, również może być potrzebna lub wymagana przez właściwy organ. Informacje te mogą być przydatne dla zrozumienia toksyczności oraz potencjału akumulacji i trwałości badanej substancji chemicznej i metabolitów. Należy podać uzasadnienie wyboru próbek; próbki do analizy na ogół powinny być takie same, jak określone powyżej (zob. pkt 37).

▼M4

39. Oznaczanie ilościowe promieniotwórczości na potrzeby badań dystrybucji w tkankach można przeprowadzić poprzez wycięcie organów, ich homogenizację, spalenie lub rozpuszczenie, a następnie poddanie uwięzionych pozostałości analizie za pomocą scyntylacyjnego licznika cieczowego. Pewne techniki, obecnie znajdujące się na różnych etapach rozwoju, np. ilościowa autoradiografia całego ciała i mikroskopowa autoradiografia receptorów, mogą okazać się przydatne przy określaniu dystrybucji badanej substancji chemicznej w organach lub tkankach (3) (4).

40. W przypadku dróg narażenia innych niż droga doustna należy pobrać i przeanalizować określone tkanki, takie jak płuca – w badaniach inhalacyjnych lub skóra – w badaniach z zastosowaniem dermalnej drogi podania. Zob. pkt 74–78.

Metabolizm

41. Wydaliny (i w stosownych przypadkach osocze) należy zbierać w celu identyfikacji i pomiaru ilościowego niezmienionej badanej substancji chemicznej i metabolitów zgodnie z opisem w pkt 44–49. Dopuszczalne jest łączenie wydalin, aby ułatwić identyfikację metabolitu w danej grupie otrzymującej dawkę. Zalecane jest profilowanie metabolitów pochodzących z każdego okresu. Jeżeli uniemożliwia to brak próbki lub promieniotwórczość, dopuszczalne jest jednak łączenie moczu i kału z kilku punktów czasowych, lecz niedopuszczalne jest łączenie wydalin z grup różnej płci lub otrzymujących odmienne dawki. W celu zbadania moczu, kału, pozostałości promieniotwórczości u zwierząt poddanych działaniu substancji i w stosownych przypadkach żółci należy wykorzystać odpowiednie metody ilościowe i jakościowe.

42. Należy dołożyć rozsądnych starań, aby zidentyfikować wszystkie metabolity obecne na poziomie 5 % podanej dawki lub wyższym oraz określić układ metaboliczny badanej substancji chemicznej. Badaną substancję chemiczną, którą scharakteryzowano w wydalinach jako stanowiącą co najmniej 5 % podanej dawki, należy zidentyfikować. Identyfikacja odnosi się do dokładnego strukturalnego określenia składników. Zazwyczaj identyfikacji towarzyszy albo chromatografia równoległa metabolitu o znanych standardach z zastosowaniem dwóch odmiennych układów, albo techniki umożliwiające pozytywną identyfikację strukturalną, takie jak spektrometria masowa, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) itd. W przypadku chromatografii równoległej technik chromatograficznych wykorzystujących tę samą fazę stacjonarną przy dwóch różnych układach rozpuszczalników nie uważa się za odpowiednią weryfikację tożsamości metabolitu za pomocą dwóch metod, ponieważ metody te nie są niezależne. Identyfikację poprzez chromatografię równoległą należy przeprowadzić z zastosowaniem dwóch odmiennych, niezależnych analitycznie układów, takich jak chromatografia cienkowarstwowa w normalnym i odwróconym układzie faz (TLC) i wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). O ile rozdzielanie chromatograficzne charakteryzuje się wystarczającą jakością, dodatkowe potwierdzenie za pomocą metod spektroskopowych nie jest potrzebne. Ewentualnie jednoznaczną identyfikację można również uzyskać, korzystając z metod dostarczających informacje strukturalne, takich jak: chromatografia cieczowa/spektometria masowa (LC-MS) lub chromatografia cieczowa/tandemowa spektometria masowa (LC-MS/MS), chromatografia gazowa/spektometria masowa (GC-MS) oraz spektometria NMR.

43. Jeżeli identyfikacja metabolitów obecnych na poziomie 5 % podanej dawki lub wyższym jest niemożliwa, w sprawozdaniu końcowym należy przedstawić uzasadnienie/wyjaśnienie. Aby uzyskać lepsze zrozumienie szlaku metabolicznego na potrzeby oceny zagrożenia lub ryzyka związanego z badaną substancją chemiczną, właściwa może być identyfikacja metabolitów stanowiących mniej niż 5 % podanej dawki. W miarę możliwości należy podać potwierdzenie strukturalne. Może ono obejmować profilowanie w osoczu, krwi lub innych tkankach.

▼M4

Wydalanie

44. Szybkość i stopień wydalania podanej dawki należy określić poprzez pomiar odsetka odzyskanej (promieniotwórczej) dawki z moczu, kału i wydychanego powietrza. Dane te pomogą również w określeniu bilansu masy. Ilości badanej substancji chemicznej (promieniotwórczości) wydalonej w moczu, kale i wydychanym powietrzu należy określać w odpowiednich odstępach czasowych (zob. pkt 47–49). Doświadczenia z powtarzanym dawkowaniem należy odpowiednio zaprojektować, aby umożliwić zbieranie danych dotyczących wydalin w celu zrealizowania celów opisanych w pkt 26. Umożliwi to porównanie z doświadczeniami z pojedynczą dawką.

45. Jeżeli badanie pilotażowe wykazało, że w wydychanym powietrzu nie jest wydalana istotna ilość badanej substancji chemicznej (promieniotwórczości) (zgodnie z pkt 49), wówczas w ostatecznym badaniu wydychane powietrze nie musi być gromadzone.

46. Każde zwierze należy umieścić w oddzielnej jednostce metabolicznej w celu zebrania wydalin (moczu, kału i wydychanego powietrza). Na koniec każdego okresu zbierania (zob. pkt 47–49) jednostkę metaboliczną należy spłukać odpowiednim rozpuszczalnikiem (tzw. „materiał wypłukany z klatki"), aby zapewnić maksimum odzysku badanej substancji chemicznej (promieniotwórczości). Zbieranie wydalin należy zakończyć 7 dnia lub po odzyskaniu co najmniej 90 % podanej dawki, w zależności od tego, co nastąpi wcześniej.

47. Całkowitą ilość badanej substancji chemicznej (promieniotwórczości) w moczu należy określić dla przynajmniej dwóch punktów czasowych w pierwszym dniu zbierania, z czego jeden punkt powinien mieć miejsce 24 godziny po podaniu dawki, a następnie każdego dnia aż do zakończenia badania. Zachęca się wybranie więcej niż dwóch punktów zbierania moczu w pierwszym dniu (np. po 6, 12 i 24 godzinach). Należy przeanalizować wyniki badań pilotażowych, aby uzyskać informacje dotyczące innych lub dodatkowych punktów czasowych w odniesieniu do zbierania moczu. Należy podać uzasadnienie harmonogramu zbierania.

48. Całkowitą ilość badanej substancji chemicznej (promieniotwórczości) w kale należy określać codziennie, począwszy od 24 godzin od podania dawki aż do zakończenia badania, chyba że badania pilotażowe wskazują na inne lub dodatkowe punkty czasowe w odniesieniu do zbierania kału. Należy podać uzasadnienie innego harmonogramu zbierania kału.

49. Gromadzenie wydychanego CO_2 i innych lotnych materiałów można przerwać w danym doświadczeniu badawczym, jeżeli w wydychanym powietrzu wykryto mniej niż 1 % podanej dawki w okresie zbierania powietrza wynoszącym 24 godziny.

Badania przebiegu w czasie

Kinetyka osocza/krwi

50. Celem tych badań jest uzyskanie szacunków dotyczących podstawowych parametrów toksykokinetycznych [np. C_{max}, T_{max}, okres półtrwania ($t_{1/2}$), pole pod krzywą] w odniesieniu do badanej substancji chemicznej. Badania te można przeprowadzać w ramach jednej dawki lub – co bardziej prawdopodobne – przy co najmniej dwóch dawkach. Dawkę należy określić zgodnie z charakterem doświadczenia lub zagadnieniem, którego ono dotyczy. Dane dotyczące kinetyki mogą być potrzebne w odniesieniu do takich kwestii, jak biodostępność badanej substancji chemicznej, lub dla celów wyjaśnienia skutków dawki dla klirensu (np. czy klirens jest nasycony w sposób zależny od dawki).

51. Na potrzeby tych badań w każdej grupie otrzymującej dawkę powinny znaleźć się co najmniej cztery zwierzęta jednej płci. Płeć wykorzystanych zwierząt należy uzasadnić. Należy rozważyć wykorzystanie obu płci (czterech samców i czterech samic), jeżeli istnieją dowody potwierdzające znaczne różnice w toksyczności związane z płcią.

▼M4

52. Po podaniu badanej substancji chemicznej (znakowanej izotopowo) należy pobrać próbki krwi od każdego zwierzęcia w odpowiednich punktach czasowych za pomocą odpowiedniej metody pobierania próbek. Rozmiar i liczba próbek krwi, które można uzyskać od pojedynczego zwierzęcia, mogą być ograniczone potencjalnymi skutkami powtarzanego pobierania próbek na zdrowie/fizjologię zwierzęcia lub czułością metody analitycznej. Próbki należy poddać analizie w odniesieniu do każdego zwierzęcia. W pewnych okolicznościach (np. przy charakterystyce metabolitu) konieczne może się okazać łączenie próbek pochodzących od więcej niż jednego zwierzęcia. Próbki zbiorcze należy wyraźnie zidentyfikować i podać wyjaśnienie łączenia próbek. W przypadku stosowania badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo właściwa może być analiza obecnej promieniotwórczości ogółem. W takiej sytuacji promieniotwórczość ogółem należy przeanalizować w krwi pełnej i osoczu lub w osoczu i krwinkach czerwonych, aby umożliwić obliczenie współczynnika podziału krew/osocze. W innych okolicznościach konieczne może być bardziej szczegółowe badanie wymagające identyfikacji związku macierzystego lub metabolitów bądź oceny wiązań białkowych.

Kinetyka innych tkanek

53. Celem tych badań jest uzyskanie informacji na temat przebiegu w czasie, aby odpowiedzieć na pytania związane z takimi kwestiami, jak: charakter działania toksycznego, bioakumulacja lub biotrwałość, poprzez określenie poziomów badanej substancji chemicznej w różnych tkankach. Wybór tkanek i liczba ocenianych punktów czasowych będą zależeć od kwestii, którą należy zbadać, i od bazy danych toksykologicznych dotyczących badanej substancji chemicznej. W projekcie tych dodatkowych badań kinetyki tkanek należy uwzględnić informacje zgromadzone zgodnie z opisem zawartym w pkt 37–40. Badania te mogą obejmować dawkowanie jednorazowe lub powtarzane. Należy przedstawić szczegółowe uzasadnienie zastosowanego podejścia.

54. Powody przeprowadzania badań kinetycznych innych tkanek mogą obejmować:

— dowody na wydłużony okres półtrwania w krwi, co wskazuje na możliwość akumulacji badanej substancji chemicznej w różnych tkankach, lub

— chęć sprawdzenia, czy w określonych tkankach osiągnięto poziom w stanie ustalonym (np. w badaniach z powtarzanym dawkowaniem, nawet jeżeli mogło dojść do widocznego osiągnięcia poziomu stężenia badanej substancji chemicznej we krwi w stanie ustalonym, może potrzebne być upewnienie się, że stan ustalony został osiągnięty również w tkankach docelowych).

55. W przypadku tego rodzaju badań przebiegu w czasie odpowiednią dawkę badanej substancji chemicznej należy podać drogą doustną co najmniej czterem zwierzętom na dawkę w każdym punkcie czasowym i monitorować w wybranych tkankach przebieg dystrybucji w czasie. Można wykorzystać tylko jedną płeć, chyba że zaobserwowano toksyczność zależną od płci. To, czy analiza obejmie promieniotwórczość ogółem, czy substancję macierzystą lub metabolity, będzie też zależało od kwestii, której badanie dotyczy. Ocenę dystrybucji w tkance należy przeprowadzić za pomocą odpowiednich technik.

Indukcja/inhibicja enzymatyczna

56. Badania dotyczące możliwych skutków indukcji/inhibicji enzymatycznej lub biotransformacji badanej substancji chemicznej mogą być konieczne w co najmniej jednym z następujących przypadków:

1) dostępne dowody wskazują na zależność pomiędzy biotransformacją badanej substancji chemicznej a zwiększoną toksycznością;

2) dostępne dane dotyczące toksyczności wskazują na nieliniową zależność pomiędzy dawką a metabolizmem;

▼M4

3) wyniki badań dotyczących identyfikacji metabolitów wskazują na identyfikację potencjalnie toksycznego metabolitu, który mógł zostać wytworzony poprzez ścieżkę enzymatyczną wywołaną przez badaną substancję chemiczną;

4) w odniesieniu do wyjaśnienia skutków, co do których zakłada się, że są związane ze zjawiskiem indukcji enzymatycznej;

5) jeżeli w profilu metabolicznym badanej substancji zaobserwowano zmiany istotne pod względem toksykologicznym w ramach doświadczeń *in vitro* lub *in vivo* prowadzonych na innych gatunkach lub w innych warunkach, konieczne może być scharakteryzowanie zaangażowanych enzymów (np. enzymy fazy I, takie jak izoenzymy układu monooksygenaz zależnych od cytochromu P450, enzymy fazy II, takie jak izoenzymy siarkotransferazy lub transferaza urydynodifosfoglukuronowa bądź wszelkie inne istotne enzymy). Informacje te można wykorzystać do oceny zasadności wykorzystania danego gatunku w ekstrapolacji gatunkowej.

57. Należy zastosować odpowiednie protokoły badania służące do oceny zmian w toksykokinetyce związanych z badaną substancją chemiczną, poddane stosownej walidacji i uzasadnione. Przykładowy projekt badania obejmuje powtarzane podawanie badanej substancji chemicznej nieznakowanej izotopowo, następnie podanie w 14. dniu pojedynczej dawki znakowanej izotopowo lub powtarzane podawanie badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo i pobieranie próbek w 1., 7. i 14. dniu w celu określenia profilów metabolitów. Powtarzane podawanie badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo może również dostarczyć informacji na temat bioakumulacji (zob. pkt 26).

METODY UZUPEŁNIAJĄCE

58. Uzupełniające rodzaje podejścia wykraczające poza doświadczenia *in vivo* opisane w niniejszej metodzie badawczej mogą dostarczyć przydatnych informacji na temat wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i eliminacji badanej substancji chemicznej u niektórych gatunków.

Wykorzystywanie informacji z badań *in vitro*

59. W badaniach *in vitro* z zastosowaniem odpowiednich układów badawczych można rozważyć kilka kwestii dotyczących metabolizmu badanej substancji chemicznej. Do badania możliwych metabolitów można wykorzystywać świeżo wyizolowane lub hodowane hepatocyty i frakcje subkomórkowe (np. mikrosomy i cytozol lub frakcję S9) wątroby. Metabolizm miejscowy w organie docelowym, np. w płucu, może mieć znaczenie dla oceny ryzyka. Dla tych celów użyteczne mogą być mikrosomalne frakcje tkanek docelowych. Badania z mikrosomami mogą być przydatne, jeżeli chodzi o uwzględnienie potencjalnych różnic płci i etapu życia oraz scharakteryzowanie parametrów enzymatycznych (K_m i V_{max}), które mogą pomóc w ocenie zależności metabolizmu od dawki w odniesieniu do poziomów narażenia. Ponadto mikrosomy mogą być przydatne do identyfikowania konkretnych enzymów mikrosomalnych biorących udział w metabolizmie badanej substancji chemicznej, które mogą być istotne w ekstrapolacji gatunkowej (zob. też pkt 56). Potencjał indukcji biotransformacji można również badać przy użyciu frakcji subkomórkowych wątroby (np. mikrosomów i cytozolu) zwierząt wcześniej poddanych działaniu danej badanej substancji chemicznej, *in vitro* poprzez badania indukcji w hepatocytach lub z wykorzystaniem określonych linii komórkowych oddających odpowiednie enzymy. W pewnych okolicznościach i w odpowiednich warunkach można wziąć pod uwagę użycie frakcji subkomórkowych pochodzących z tkanek ludzkich w celu określenia potencjalnych różnic między gatunkami pod względem biotransformacji. Te wyniki badań *in vitro* mogą również być przydatne do opracowania modeli PBTK (5).

▼M4

60. Badania wchłaniania przez skórę *in vitro* mogą dostarczyć dodatkowych informacji na potrzeby scharakteryzowania wchłaniania (6).

61. Na potrzeby kwestii podobnych do tych, w których bada się mikrosomy wątroby, można wykorzystywać pierwotne hodowle komórkowe z komórek wątroby i płaty świeżej tkanki. W niektórych przypadkach można uzyskać odpowiedź na konkretne pytania przy użyciu linii komórkowych o określonej ekspresji odpowiedniego enzymu lub modyfikowanych linii komórkowych. W pewnych sytuacjach przydatne może być przeanalizowanie za pomocą badań *in vitro* zahamowania i indukowania określonych izoenzymów cytochromu P450 (np. CYP1A1, 2E1, 1A2 i in.) lub enzymów fazy II przez związek macierzysty. Uzyskane informacje mogą być użyteczne w odniesieniu do związków o podobnej strukturze.

Wykorzystywanie danych toksykokinetycznych z badań toksyczności jako informacji uzupełniających

62. Analiza próbek krwi, tkanek lub wydalin uzyskanych podczas przeprowadzania wszelkich innych badań toksyczności może dostarczyć danych na temat biodostępności, zmian stężenia w osoczu w czasie (pole pod krzywą, C_{max}), potencjału bioakumulacji, klirensu oraz zmian metabolizmu i kinetyki zależnych od płci lub etapu życia.

63. Rozważania dotyczące projektu badania można wykorzystać, aby odpowiedzieć na pytania odnoszące się do: nasycenia szlaków wchłaniania, biotransformacji lub wydalania przy wyższych poziomach dawkowania; działania nowych szlaków metabolicznych przy większych dawkach oraz ograniczenia toksycznych metabolitów do wyższych dawek.

64. W innych rozważaniach związanych z oceną zagrożenia można uwzględniać takie kwestie, jak:

— związana z wiekiem wrażliwość wynikająca z różnic w statusie bariery krew-mózg, zdolności metabolicznej nerek lub zdolnościach detoksykacyjnych,

— wrażliwość subpopulacji wynikająca z różnic w zdolności do biotransformacji lub innych różnic toksykokinetycznych,

— stopień narażenia płodu poprzez transfer przezłożyskowy substancji chemicznych lub noworodka poprzez laktację.

Korzystanie z modelowania toksykokinetycznego

65. Modele toksykokinetyczne mogą być przydatne do różnych aspektów oceny zagrożenia i ryzyka, na przykład do przewidzenia narażenia ogólnoustrojowego i dawki w odniesieniu do tkanek wewnętrznych. Ponadto mogą zapewnić odpowiedzi na określone pytania dotyczące charakteru działania. Modele te mogą stanowić podstawę ekstrapolacji w odniesieniu do gatunku, dróg narażenia i schematów dawkowania oraz podstawę oceny ryzyka dla ludzi. Dane przydatne do opracowania fizjologicznych modeli toksykokinetycznych (PBTK) dla badanej substancji chemicznej podawanej danemu gatunkowi obejmują 1) współczynniki podziału; 2) stałe biochemiczne i parametry fizjologiczne; 3) parametry wchłaniania dla poszczególnych dróg narażenia; oraz 4) dane kinetyczne *in vivo* do oceny modelu [np. parametry klirensu dla odpowiednich (> 10 %) dróg wydalania, K_m i V_{max} dla metabolizmu]. Dane doświadczalne wykorzystane do opracowywania modelu należy wygenerować za pomocą wiarygodnych naukowo metod, a wyniki modelu poddać walidacji. Parametry specyficzne dla badanej substancji chemicznej i gatunku, takie jak: współczynniki wchłaniania, podział krew-tkanka i stałe metaboliczne, często określa sie w celu ułatwienia opracowania modeli nieopartych na przedziałach lub modeli fizjologicznych (7).

▼M4

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

66. Zaleca się, aby sprawozdanie z badania zawierało spis treści.

Treść sprawozdania

67. Treść sprawozdania powinna obejmować informacje uwzględnione w niniejszej metodzie badawczej, które należy uporządkować w sekcje i punkty w następujący sposób:

Streszczenie

68. Ta sekcja sprawozdania z badania powinna zawierać streszczenie projektu badania i opis zastosowanych metod. Należy w niej również podkreślić kluczowe wyniki dotyczące bilansu masy, charakteru i ilości metabolitów, pozostałości w tkankach, klirensu, potencjału bioakumulacji, różnic związanych z płcią itd. Streszczenie należy przedstawić w sposób na tyle szczegółowy, aby umożliwić ocenę wyników.

Wprowadzenie

69. Ta sekcja sprawozdania powinna obejmować cele badania, jego uzasadnienie i projekt, a także odpowiednie źródła i informacje wprowadzające.

Materiały i metody

70. Ta sekcja sprawozdania powinna zawierać szczegółowy opis wszystkich istotnych informacji, w tym:

a) Badana substancja chemiczna

Ta podsekcja powinna zawierać identyfikację badanej substancji chemicznej: nazwę chemiczną, strukturę molekularną, jakościowe i ilościowe oznaczenie jej składu chemicznego, czystość chemiczną i w miarę możliwości rodzaj i ilości jakichkolwiek zanieczyszczeń. Powinna również obejmować informacje dotyczące właściwości fizykochemicznych, w tym stanu skupienia, barwy, całkowitej rozpuszczalności lub współczynnika podziału, stabilności oraz w stosownych przypadkach działania żrącego. W stosownych przypadkach należy przedstawić informacje na temat izomerów. Jeżeli badana substancja chemiczna jest znakowana izotopowo, w tej podsekcji należy podać następujące informacje: typ nuklidu promieniotwórczego, pozycję znacznika, aktywność właściwą i czystość radiochemiczną.

Należy podać typ lub opis wszelkich nośników, rozpuszczalników, nośników zawiesin oraz emulgatorów lub innych materiałów wykorzystywanych do podawania badanej substancji chemicznej.

b) Badane zwierzęta

Ta podsekcja powinna zawierać informacje na temat badanych zwierząt, w tym dotyczące wyboru i uzasadnienia wyboru gatunku, szczepu i wieku w chwili rozpoczęcia badania, płci, jak również masy ciała, stanu zdrowia i hodowli.

c) Metody

Ta podsekcja powinna zawierać szczegółowe informacje na temat projektu badania i zastosowanej metodyki. Powinna obejmować opis:

(1) w stosownych przypadkach – uzasadnienia wszelkich zmian drogi narażeniu i warunków narażenia;

▼M4

(2) uzasadnienia wyboru poziomów dawkowania;

(3) w stosownych przypadkach – opis badań pilotażowych wykorzystanych w układzie doświadczalnym dalszych badań. Należy przedstawić dane potwierdzające badanie pilotażowe;

(4) sposobu przygotowywania roztworów dawek oraz rodzaju rozpuszczalnika lub nośnika, jeżeli został użyty;

(5) liczby grup badanych i liczby zwierząt na grupę;

(6) poziomów dawkowania i objętości dawek (oraz aktywności właściwej dawki w przypadku zastosowania izotopów promieniotwórczych);

(7) drogi i metody podawania;

(8) częstotliwości dawkowania;

(9) okresu wstrzymania podawania pokarmu (jeżeli zastosowano);

(10) promieniotwórczości na zwierzę ogółem;

(11) postępowania ze zwierzętami;

(12) pobierania próbek i postępowania z nimi;

(13) metod analitycznych wykorzystanych w celu oddzielenia, pomiaru ilościowego i identyfikacji metabolitów;

(14) granicy wykrywalności w odniesieniu do zastosowanych metod;

(15) innych zastosowanych pomiarów i procedur doświadczalnych (w tym walidacji metod wykorzystanych do analizy metabolitów).

d) Analiza statystyczna

Jeżeli do analizy wyników badania zastosowano analizę statystyczną, wówczas sprawozdanie powinno zawierać wystarczające informacje dotyczące użytych metod analizy i oprogramowania komputerowego, tak aby niezależny recenzent/statystyk mógł dokonać powtórnej oceny i odtworzyć analizę.

W przypadku badań z wykorzystaniem modeli układów, takich jak fizjologiczny model toksykokinetyczny (PBTK), prezentacja modeli powinna obejmować pełny opis modelu, aby umożliwić jego niezależną rekonstrukcję i walidację (zob. pkt 65 i dodatek: Definicje).

Wyniki

71. Wszystkie dane należy zestawić w formie tabeli z odpowiednią oceną statystyczną oraz opisać w tekście tej sekcji. Dane z pomiarów promieniotwórczości należy streścić i przedstawić w formie odpowiedniej dla badania, zwykle w ekwiwalentach mikrogramów lub miligramów na masę próbki, chociaż można zastosować także inne jednostki. Sekcja ta powinna zawierać ilustracje graficzne wyników, kopię reprezentatywnych danych chromatograficznych i spektrometrycznych, nazwy/oznaczenie ilościowe metabolitów oraz proponowane szlaki metaboliczne, w tym strukturę molekularną metabolitów. Ponadto w stosownych przypadkach należy zawrzeć w tej sekcji następujące informacje:

(1) ilość i procent odzysku promieniotwórczości w moczu, kale, wydychanym powietrzu oraz w płynach pozostałych po myciu klatek z moczu i kału.

— w przypadku badań z zastosowaniem dermalnej drogi podania należy również uwzględnić dane dotyczące odzysku badanej substancji chemicznej ze skóry poddanej działaniu substancji i płynów pozostałych po przemywaniu skóry oraz rezydualnej promieniotwórczości w skórze, opisując przy tym urządzenie i jednostkę metaboliczną, a także wyniki badania przemywania skóry. Dalsze omówienie – zob. pkt 74–77,

▼M4

— w przypadku badań z zastosowaniem inhalacyjnej drogi podania należy również uwzględnić dane dotyczące odzysku badanej substancji chemicznej z płuc i tkanek nosa (8). Dalsze omówienie – zob. pkt 78;

(2) dystrybucję w tkankach, wyrażoną jako procent podanej dawki i stężenia (w ekwiwalentach mikrogramów na gram tkanki), oraz proporcje tkanki do krwi lub tkanki do osocza;

(3) bilans materiałowy opracowany na podstawie każdego badania wiążącego się z testami tkanek ciała i wydalin;

(4) stężenie w osoczu i parametry toksykokinetyczne (biodostępność, pole pod krzywą, C_{max}, T_{max}, klirens, okres półtrwania) po podaniu właściwą drogą (drogami) narażenia;

(5) szybkość i stopień wchłaniania badanej substancji chemicznej po podaniu właściwą drogą (drogami) narażenia;

(6) ilości badanej substancji chemicznej i metabolitów (wyrażone jako procent podanej dawki) zebranych w wydalinach;

(7) odniesienie do danych w załączeniu, zawierających dane dotyczące poszczególnych zwierząt w odniesieniu do wszystkich punktów końcowych pomiarów (np. dawkowanie, procent odzysku, stężenia, parametry toksykokinetyczne itp.);

(8) rysunek, na którym przedstawione są proponowane szlaki metaboliczne i struktura molekularna metabolitów.

Omówienie i wnioski

72. W tej sekcji autor lub autorzy powinni:

(1) podać proponowany szlak metaboliczny na podstawie wyników metabolizmu i rozmieszczenia badanej substancji chemicznej;

(2) omówić ewentualne różnice między gatunkami i płciami pod względem rozmieszczenia lub biotransformacji badanej substancji chemicznej;

(3) zestawić w formie tabeli i omówić w stosownych przypadkach rodzaj i ilość metabolitów, klirens, potencjał bioakumulacji oraz poziom pozostałości związku macierzystego lub metabolitów w tkankach, a także możliwe zmiany parametrów toksykokinetycznych uwarunkowane dawką;

(4) włączyć do tej sekcji wszelkie istotne dane toksykokinetyczne uzyskane w trakcie prowadzenia badań toksyczności;

(5) podać zwięzłą konkluzję, którą mogą potwierdzać wyniki badania;

(6) dodać sekcje (w razie potrzeby lub w stosownych przypadkach).

73. Dodatkowe sekcje należy wykorzystać do zamieszczenia potwierdzających danych bibliograficznych, tabel, rysunków, dodatków itp.

▼M4

ALTERNATYWNE DROGI NARAŻENIA

Droga dermalna

Poddawanie działaniu substancji drogą dermalną

74. Niniejsza sekcja zawiera szczegółowe informacje na temat badania toksykokinetyki badanej substancji chemicznej podawanej drogą dermalną. W odniesieniu do wchłaniania przez skórę należy zapoznać się z rozdziałem B.44 niniejszego załącznika [Absorpcja przez skórę: metoda *in vivo* (9)]. W przypadku innych punktów końcowych, takich jak dystrybucja i metabolizm, można stosować niniejszą metodę badawczą B.36. Przy poddawaniu działaniu badanej substancji chemicznej drogą dermalną należy zastosować co najmniej jeden poziom dawkowania. Badana substancja chemiczna (np. czysty, rozcieńczony lub zmieszany materiał zawierający badaną substancję chemiczną, który nakładany jest na skórę) powinna być taka sama (lub być realistycznym surogatem) jak substancja, na której działanie narażeni mogą być ludzie lub inne potencjalne gatunki docelowe. Poziom (poziomy) dawkowania należy wybrać zgodnie z pkt 20–26 niniejszej metody badawczej. Czynniki, które można wziąć pod uwagę przy doborze dawki na skórę, obejmują oczekiwane narażenie ludzi lub dawki, przy których w innych badaniach toksyczności dermalnej zaobserwowano toksyczność. Dawka (dawki) na skórę należy w razie potrzeby rozpuścić w odpowiednim nośniku i aplikować w ilości odpowiedniej do dostarczenia dawki. Tuż przed badaniem należy wystrzyc sierść na grzbietowej powierzchni tułowia badanych zwierząt. Można zastosować golenie, lecz należy je przeprowadzić około 24 godziny przed rozpoczęciem badania. Podczas przycinania lub golenia sierści należy uważać, aby nie uszkodzić skóry, gdyż mogłoby to zmienić jej przepuszczalność. Na potrzeby zastosowania badanej substancji chemicznej należy usunąć sierść z ok. 10 % powierzchni ciała. W przypadku substancji wysoce toksycznych można je nanieść na powierzchnię mniejszą niż ok. 10 %, jednak należy dążyć do tego, aby pokryć jak największy obszar cienką i równomierną warstwą. We wszystkich grupach w badaniu narażenia dermalnego należy wykorzystać taką samą powierzchnię poddawania działaniu substancji. Powierzchnię, na którą dawkowana jest substancja, trzeba chronić odpowiednią dobrze umocowaną osłoną. Zwierzęta powinny być trzymane oddzielnie.

75. Należy przeprowadzić badanie przemywania skóry w celu oszacowania ilości aplikowanej dawki badanej substancji chemicznej, którą można usunąć ze skóry przez umycie łagodnym mydłem i wodą powierzchni skóry poddanej działaniu tej substancji. Badanie to może również pomóc w określeniu bilansu masy, gdy badana substancja chemiczna podawana jest drogą dermalną. Dla celów tego badania przemywania skóry należy dwóm zwierzętom podać pojedynczą dawkę badanej substancji chemicznej. Wyboru poziomu dawkowania dokonuje się zgodnie z pkt 23 niniejszej metody badawczej (zob. również pkt 76, w którym omówiono czasu kontaktu ze skórą). Ilości badanej substancji chemicznej odzyskane w płynach pozostałych po przemywaniu należy określić, aby oszacować skuteczność usuwania tej substancji poprzez mycie.

76. Badaną substancję chemiczną należy nałożyć na skórę i trzymać przez co najmniej 6 godzin, o ile nie uniemożliwia tego działanie żrące tej substancji. Po zdjęciu osłony obszar poddany działaniu substancji należy umyć zgodnie z procedurą określoną w badaniu przemywania skóry (zob. pkt 75). Zarówno osłonę, jak i płyny pozostałe po przemywaniu należy poddać analizie pod kątem pozostałości badanej substancji chemicznej. Na zakończenie badania każde zwierzę należy humanitarnie uśmiercić zgodnie z (2) i usunąć skórę poddawaną działaniu substancji. Odpowiedni wycinek tej skóry należy poddać analizie w celu określenia pozostałości badanej substancji chemicznej (promieniotwórczości).

77. Dla celów toksykokinetycznej oceny produktów farmaceutycznych potrzebne mogą być odmienne procedury, zgodne z odpowiednim systemem regulacji.

▼M4

Droga inhalacyjna

78. Należy zastosować jedno stężenie (lub w razie potrzeby większą liczbę stężeń) badanej substancji chemicznej. Stężenie (stężenia) należy wybrać zgodnie z pkt 20–26 niniejszej metody badawczej. Zabiegi poddawania działaniu substancji drogą inhalacyjną należy przeprowadzać przy użyciu przyrządu z maską inhalacyjną umożliwiającą narażenie tylko przez nos lub tylko głowy, aby zapobiec wchłanianiu substancji innymi drogami narażenia (8). Jeżeli stosowane są inne warunki narażenia inhalacyjnego, należy udokumentować uzasadnienie zmiany procedury. Czas trwania narażenia drogą inhalacyjną powinien być określony; typowe narażenie trwa 4–6 h.

BIBLIOGRAFIA:

(1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials nr 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paryż.

(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 nr 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paryż.

(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) Rozdział B.45 niniejszego załącznika. Absorpcja przez skórę: metoda *in vitro*.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based-Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document nr 9. Genewa, Światowa Organizacja Zdrowia, Międzynarodowy Program Bezpieczeństwa Chemicznego.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment nr 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paryż.

(9) Rozdział B.44 niniejszego załącznika. Absorpcja przez skórę: metoda *in vivo*.

(10) Barton HA, i in. (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 i Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, wyd. drugie, Marcel Dekker, Inc., Nowy Jork.

▼M4

Dodatek

DEFINICJE

Wchłanianie: proces absorpcji chemikaliów w głąb tkanek lub przez tkanki. Wchłanianie dotyczy związku macierzystego i wszystkich jego metabolitów. Nie mylić z „biodostępnością".

Akumulacja (bioakumulacja): wzrost ilości badanej substancji chemicznej w czasie w tkankach (zwykle tkankach tłuszczowych w następstwie powtarzanego narażenia); jeśli ilość badanej substancji chemicznej wprowadzana do organizmu jest większa niż szybkość, z jaką jest wydalana, organizm gromadzi tę substancję i może dojść do osiągnięcia toksycznego stężenia badanej substancji chemicznej.

ADME: akronim „Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion" (ang. wchłanianie, dystrybucja, metabolizm i wydalanie).

AUC: (pole pod krzywą stężenia w osoczu w czasie): pole pod krzywą na wykresie stężenia badanej substancji chemicznej w osoczu w czasie. Oznacza ono całkowitą ilość badanej substancji chemicznej wchłoniętą przez organizm we wcześniej określonym czasie. W warunkach liniowych AUC (od czasu zerowego do nieskończoności) jest proporcjonalne do całkowitej ilości badanej substancji chemicznej wchłoniętej przez organizm, niezależnie od tempa wchłaniania.

Autoradiografia: (autoradiografia całego ciała): stosowana w celu jakościowego lub ilościowego określenia umiejscowienia w tkankach badanej promieniotwórczej substancji chemicznej; w technice tej wykorzystuje się kliszę rentgenowską lub - od niedawna – obrazowanie cyfrowe z użyciem fosforu w celu zwizualizowania radioaktywnie znakowanych cząsteczek lub fragmentów cząsteczek poprzez rejestrowanie promieniowania emitowanego w badanym obiekcie. W porównaniu z sekcją narządów ilościowa autoradiografia całego ciała może mieć pewne zalety dla oceny dystrybucji badanej substancji chemicznej oraz oceny całkowitego odzysku i rozkładu materiału promieniotwórczego w tkankach. Jedną z istotnych zalet jest na przykład to, że autoradiografia może być stosowana na zabarwionym modelu zwierzęcym w celu ocenienia ewentualnego łączenia się badanej substancji chemicznej z melaniną, która może wiązać się z pewnymi cząsteczkami. Mimo że technika ta może zapewnić obejmujący całe ciało wygodny przegląd miejsc wiązania o dużej zdolności i niskim powinowactwie, może ona jednak być ograniczona pod względem rozpoznawania swoistych miejsc docelowych, takich jak miejsca wiązania receptorów, gdzie wykrycie wymaga stosunkowo wysokiej rozdzielczości oraz wysokiej czułości. W przypadku korzystania z autoradiografii doświadczenia mające na celu określenie bilansu masy podawanego związku należy przeprowadzać jako odrębną grupę lub w ramach oddzielnego badania, począwszy od doświadczenia dotyczącego dystrybucji w tkankach, polegającego na homogenizacji wszystkich wydalin (które mogą również obejmować wydychane powietrze) i całych ciał oraz poddaniu ich analizie za pomocą scyntylacyjnego licznika cieczowego.

Wydalanie z żółcią: wydalanie z dróg żółciowych.

Bioakumulacja: zob. „akumulacja".

Biodostępność: ułamek podanej dawki, jaki dociera do krążenia ogólnego lub jest udostępniany na miejscu aktywności fizjologicznej. Zazwyczaj biodostępność badanej substancji chemicznej odnosi się do związku macierzystego, lecz może dotyczyć też jego metabolitu. Uwzględnia się w jej ramach tylko jedną formę chemiczną. *Uwaga*: biodostępność i wchłanianie nie są tożsame. Różnica między np. wchłanianiem po podaniu doustnym (tj. obecnością w ścianie jelita i krążeniu wrotnym) a biodostępnością (tj. obecnością w krwi w krążeniu ogólnym i w tkankach) może być spowodowana między innymi rozkładem chemicznym wskutek metabolizmu w ścianie jelita lub wypływu z powrotem do światła jelita lub pierwszym przejściem przez wątrobę (10). Biodostępność składnika toksycznego (związku macierzystego lub metabolitu) jest krytycznym parametrem w ocenie ryzyka dla ludzi (ekstrapolacja dawki dużej do małej, ekstrapolacja drogi do drogi), służącym wyprowadzeniu wartości wewnętrznej z zewnętrznego NOAEL lub BMD (zastosowana dawka). W odniesieniu do skutków dla wątroby po podaniu drogą pokarmową wystarcza wchłanianie po podaniu doustnym, jednak dla każdego skutku innego niż występujący w miejscu wprowadzenia danej substancji to biodostępność, nie wchłanianie, jest na ogół bardziej wiarygodnym parametrem na potrzeby dalszego zastosowania w ocenie ryzyka.

▼M4

Biotrwałość: zob. „trwałość”.

Biotransformacja: (zwykle enzymatyczna) przemiana chemiczna badanej substancji chemicznej w inną substancję chemiczną zachodząca w ciele. Synonim „metabolizmu”.

C_{max}: maksymalne (szczytowe) stężenie we krwi (osoczu/surowicy krwi) po podaniu lub maksymalne (szczytowe) wydalanie (z moczem lub kałem) po podaniu.

Klirens: ilościowa miara szybkości, z jaką badana substancja chemiczna jest usuwana z krwi, osocza lub określonej tkanki w jednostce czasu.

Przedział: strukturalna lub biochemiczna część (lub jednostka) ciała, tkanki lub komórki, która jest oddzielona od reszty.

Ścieżki detoksykacji: szereg etapów prowadzących do eliminacji toksycznych chemikaliów z organizmu poprzez przemianę metaboliczną lub wydalenie.

Dystrybucja: rozproszenie badanej substancji chemicznej i jej pochodnych w całym organizmie.

Enzymy/izoenzymy: białka, które katalizują reakcje chemiczne. Izoenzymy są enzymami, które katalizują podobne reakcje chemiczne, lecz różnią się sekwencją aminokwasów.

Parametry enzymatyczne: K_m: stała Michaelisa oraz V_{max}: prędkość maksymalna.

Wydalanie: proces lub procesy, w drodze których podana badana substancja chemiczna lub jej metabolity są usuwane z organizmu

Egzogennie: wprowadzony spoza organizmu lub układu lub wytworzony poza nimi.

Ekstrapolacja: wywodzenie jednej nieznanej wartości lub większej ich liczby w oparciu o to, co jest znane lub zostało zaobserwowane.

Okres półtrwania ($t_{1/2}$): czas, jaki musi upłynąć, by stężenie badanej substancji chemicznej zmniejszyło się o połowę w danym przedziale. Zazwyczaj odnosi się do stężenia w osoczu lub ilości badanej substancji chemicznej w całym organizmie.

Indukcja/indukcja enzymatyczna: synteza enzymów w odpowiedzi na bodziec środowiskowy lub cząsteczkę induktora.

Liniowość/kinetyka liniowa: proces jest liniowy pod względem kinetyki, gdy wszystkie prędkości wnikania między przedziałami są proporcjonalne do obecnych ilości lub stężeń, tj. są pierwszego rzędu. W związku z tym wartości klirensu i dystrybucji są stałe, podobnie jak okresy półtrwania. Osiągane stężenia są proporcjonalne do szybkości dawkowania (narażenia), a akumulacja jest łatwiejsza do przewidzenia. Liniowość/nieliniowość można ocenić przez porównanie odpowiednich parametrów, np. pola pod krzywą po różnych dawkach lub po narażeniu jednorazowym i powtarzanym. Brak zależności od dawki może wskazywać na nasycenie enzymów biorących udział w metabolizmie danego związku chemicznego, zwiększenie pola pod krzywą po powtarzanym narażaniu w porównaniu z narażeniem jednorazowym może świadczyć o zhamowaniu metabolizmu, a zmniejszenie pola pod krzywą może być oznaką indukcji metabolizmu [zob. również (11)].

Bilans masy: rozliczanie badanej substancji chemicznej wchodzącej do układu i wychodzącej z niego.

Bilans materiałowy: zob. „bilans masy”.

▼M4

Mechanizm (charakter) toksyczności/mechanizm (charakter) działania: mechanizm działania odnosi się do konkretnych interakcji biochemicznych, przez które badana substancja chemiczna powoduje swój skutek. Charakter działania odnosi się do bardziej ogólnych szlaków prowadzących do toksyczności badanej substancji chemicznej.

Metabolizm: synonim „biotransformacji".

Metabolity: produkty metabolizmu lub procesów metabolicznych.

Wchłanianie po podaniu doustnym: procent dawki badanej substancji chemicznej wchłonięty z miejsca podania (tj. z przewodu pokarmowego). Ten krytyczny parametr można wykorzystać, aby dowiedzieć się, jaki ułamek podanej badanej substancji chemicznej dociera do żyły wrotnej, a później do wątroby.

Współczynnik podziału: znany także jako współczynnik dystrybucji, jest miarą różnicowej rozpuszczalności substancji chemicznej w dwóch rozpuszczalnikach.

Szczytowe poziomy stężenia we krwi (osoczu/surowicy krwi): maksymalne (szczytowe) stężenie we krwi (osoczu/surowicy krwi) po podaniu (zob. także „C_{max}").

Trwałość (biotrwałość): długotrwała obecność substancji chemicznej (w układzie biologicznym) ze względu na odporność na rozkład/eliminację.

Przekrój: informacje na temat punktu końcowego jednej substancji chemicznej lub większej ich liczby są wykorzystywane do przewidywania punktu końcowego docelowej substancji chemicznej.

Mikroskopowa autoradiografia receptorowa (lub mikroautoradiografia receptorowa): technika ta może być wykorzystywania do badania interakcji ksenobiotyków z określonymi miejscami tkanek lub populacjami komórek, jak na przykład w badaniach dotyczących wiązania receptorów lub określonego charakteru działania, które mogą wymagać wysokiej rozdzielczości oraz wysokiej czułości, jakie mogą być niemożliwe do osiągnięcia przy użyciu innych technik, takich jak autoradiografia całego ciała.

Droga podania (doustna, dożylna, dermalna, inhalacyjna itp.): odnosi się do sposobu wprowadzenia substancji chemicznych do ciała (np. doustnie za pomocą sondy, doustnie z pokarmem, przez skórę, przez drogi oddechowe, dożylnie itd.).

Nasycenie: stan, w którym co najmniej jeden z procesów kinetycznych (np. wchłanianie, metabolizm lub klirens) ma wartość maksymalną (odczyt „nasycony").

Czułość: zdolność metody lub instrumentu do rozróżniania reakcji pomiarowych reprezentujących różne poziomy przedmiotowej zmiennej.

Poziomy stężenia we krwi (osoczu) w stanie ustalonym: stan nierównowagi otwartego układu, w którym wszystkie siły działające na ten układ są dokładnie równoważone przez siły przeciwstawne w taki sposób, że wszystkie jego elementy mają niezmienne stężenie, mimo że substancja płynie przez układ.

Modelowanie układów (fizjologiczny model toksykokinetyczny, model farmakokinetyczny, farmakokinetycznymodel fizjologiczny, model biologiczny itp.): abstrakcyjny model, w którym używa się języka matematycznego do opisu zachowania układu.

Tkanka docelowa: tkanka, w której przejawia się główne szkodliwe działanie substancji toksycznej.

▼M4

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja chemiczna lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Dystrybucja w tkankach: odwracalny ruch badanej substancji chemicznej z jednego miejsca w ciele do drugiego. Dystrybucję w tkankach można badać poprzez wycięcie organów, ich homogenizację, spalenie i poddanie analizie za pomocą scyntylacyjnego licznika cieczowego bądź też jakościową lub ilościową autoradiografię całego ciała. Pierwsza z tych metod jest przydatna do uzyskania stężenia i procentu odzysku z tkanek i reszty ciała takich samych zwierząt, lecz może nie mieć rozdzielczości pozwalającej na zbadanie wszystkich tkanek, a całkowity odzysk może być mniejszy niż w warunkach idealnych (< 90 %). Zob. definicja drugiej metody powyżej.

$\mathbf{T_{max}}$: czas do osiągnięcia C_{max}.

Toksykokinetyka (farmakokinetyka): badanie wchłanianie, dystrybucji, metabolizmu i wydalania substancji chemicznych względem czasu.

Walidacja modeli: proces oceny odpowiedniości modelu do spójnego opisania dostępnych danych toksykokinetycznych. Modele mogą być oceniane poprzez statystyczne i wizualne porównanie modelowych prognoz z wartościami doświadczalnymi w stosunku do wspólnej zmiennej niezależnej (np. czasu). Należy uzasadnić zakres oceny w odniesieniu do zamierzonego zastosowania modelu.

▼B

B.37. **OPÓŹNIONA NEUROTOKSYCZNOŚĆ SUBSTANCJI FOSFOROORGANICZNYCH PO DUŻEJ EKSPOZYCJI**

1. **METODA**

1.1. WPROWADZENIE

Przy ocenie i oszacowaniu skutków toksycznych substancji ważne jest rozważenie potencjału niektórych klas substancji do wywoływania określonych typów neurotoksyczności, które mogą nie być wykryte w innych badaniach toksyczności. Zaobserwowano, że niektóre substancje fosforoorganiczne powodują opóźnioną neurotoksyczność i powinny być wzięte pod uwagę jako związki, które mogą być zaliczone do oszacowania.

Testy sortujące *in vitro* mogłyby być zastosowane, aby rozpoznać te substancje, które mogą powodować opóźnioną polineuropatię; jednakże negatywne wyniki badań *in vitro* nie są dowodem, że substancja testowana nie jest substancją neurotoksyczną

Zob. także Wprowadzenie ogólne część B.

1.2. DEFINICJE

Substancje fosforoorganiczne obejmują nienaładowane estry fosforoorganiczne, tioestry i bezwodniki pochodnych organicznych kwasu fosforowego(V), kwasu fosfonowego i kwasów fosforoamidowych i ich tio-pochodnych lub inne substancje, które mogą wywoływać opóźnioną neurotoksyczność obserwowaną czasami w tej klasie substancji.

Opóźniona neurotoksyczność jest objawem powiązanym z przedłużonym zwłocznym początkiem ataksji, obwodową aksonopatią w rdzeniu kręgowym i nerwach obwodowych, i zahamowaniem i starzeniem esterazy wywołującej neuropatię (NTE) w obojętnej tkance.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Substancja odniesienia może być testowana na pozytywnej grupie kontrolnej jako środek w celu wykazania, że w warunkach testu laboratoryjnego reakcja badanego gatunku nie zmieniła się znacząco.

Przykładem szeroko stosowanego środka neurotoksycznego jest ortofosforan(V) tritoilu (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, nomenklatura CAS: kwas ortofosforowy(V), ester tris(2-metylofenylowy), znany jako fosforan trikrezylu.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Substancja testowana jest podawana doustnie w pojedynczej dawce kurom domowym, które zostały zabezpieczone przed ostrymi skutkami cholinergicznymi, gdzie właściwe. Zwierzęta są obserwowane przez 21 dni pod kątem anomalii behawioralnych, ataksji, i paraliżu. Pomiary biochemiczne, w szczególności zahamowanie esterazy wywołującej neuropatię (NTE), przeprowadza się na kurach losowo wybranych z każdej grupy, prawidłowo 24 i 48 godzin po dawkowaniu. Dwadzieścia jeden dni po ekspozycji pozostałe kury są zabijane i przeprowadzane jest badanie histopatologiczne wybranych obojętnych tkanek.

▼B

1.5. OPIS METODY BADANIA

1.5.1. **Przygotowania**

Zdrowe, młode, dorosłe kury, wolne od kolidujących chorób wirusowych i leków oraz bez nieprawidłowości w sposobie chodzenia, powinny być losowo przydzielane do grupy badanej i kontrolnej oraz aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania.

Powinno się stosować klatki i zagrody wystarczająco obszerne, aby umożliwić swobodne poruszanie się kur i niezakłóconą obserwację sposobu chodzenia.

Dawkowanie substancji testowanej powinno prawidłowo przebiegać drogą doustną, stosując aplikowanie bezpośrednio do żołądka, w kapsułkach żelatynowych lub metodą porównywalną. Ciecze powinny być podawane nierozcieńczone lub rozpuszczone w odpowiednim nośniku, takim jak olej kukurydziany; substancje stałe powinny być, w miarę możliwości, rozpuszczone, ponieważ duże dawki substancji stałych w żelatynie mogą nie być absorbowane wydajnie. W przypadku nośników niewodnych powinna być znana charakterystyka toksyczna nośnika, a jeżeli nie jest znana, powinna być określona przed testem.

1.5.2. **Warunki testu**

1.5.2.1. *Zwierzęta badane*

Zalecana jest młoda, dorosła, kura domowa nioska (*Gallus gallus domesticus*), w wieku 8–12 miesięcy. Powinny być wykorzystane odmiany i rasy standardowej wielkości, które prawidłowo powinny być wcześniej hodowane w warunkach umożliwiających swobodne poruszanie się.

1.5.2.2. *Liczba i płeć*

Oprócz grupy badanej powinna być stosowana zarówno grupa kontrolna nośnika, jak i pozytywna grupa kontrolna. Grupa kontrolna nośnika powinna być traktowana w sposób identyczny, jak grupa badana z wyjątkiem tego, że podawanie substancji testowanej jest pominięte.

W każdej grupie ptaków należy wykorzystać wystarczającą liczbę kur tak, aby co najmniej sześć ptaków można było zabić do celów oznaczenia biochemicznego (trzy w każdym z dwóch punktów czasowych) i sześć mogło przeżyć okres 21-dniowej obserwacji do celów patologii.

Pozytywna grupa kontrolna może być poddawana badaniu w tym samym czasie lub też może ona być ostatnią grupą kontrolną w historii badania. Powinna składać się z co najmniej sześciu kur, poddawanych działaniu znanego opóźnionego środka neurotoksycznego, trzy kury przeznaczone są do celów biochemii i trzy do celów patologii. Zalecane jest okresowe uaktualnianie przeszłych danych. W przypadku gdy jakiś istotny element (np. rasa, żywienie, warunki przebywania) w przebiegu badania został zmieniony przez laboratorium wykonujące, należy uzyskać nowe pozytywne dane kontrolne.

▼B

1.5.2.3. *Poziomy dawki*

Aby oszacować poziom dawki, który ma być zastosowany w badaniu głównym, należy przeprowadzić badanie wstępne przy użyciu odpowiedniej liczby kur i grup poziomów dawki. Typowy i nieunikniony jest pewien poziom śmiertelności w badaniu wstępnym, w celu określenia właściwej dawki do badania głównego. Jednakże aby zapobiec śmierci z powodu ostrych skutków cholinergicznych może być użyta atropina lub inny środek ochronny, o którym wiadomo, że nie koliduje z opóźnionymi reakcjami neurotoksycznymi. Rozmaite metody badania mogą być stosowane w celu oszacowania maksymalnej, niewywołującej śmierci dawki substancji testowanej (zob. metoda B.1 bis). Poprzednie dane dotyczące kur lub inne dane toksykologiczne mogą być pomocne przy doborze dawki.

W głównym badaniu poziom dawki substancji testowanej powinien być możliwie najwyższy, biorąc pod uwagę wyniki wstępnego badania doboru dawki i górną dawkę graniczną wynoszącą 2 000 mg/kg masy ciała. Jakakolwiek śmiertelność, która może wystąpić, nie powinna zakłócić przeżycia 21 dni przez wystarczającą liczbę zwierząt do celów biochemii (sześć) i histologii (sześć). Powinna być użyta atropina lub inny środek ochronny, o którym wiadomo, że nie koliduje z opóźnionymi reakcjami neurotoksycznymi, w celu zapobieżenia śmierci z powodu ostrych skutków cholinergicznych.

1.5.2.4. *Test graniczny*

Jeżeli test przy poziomie dawki wynoszącym co najmniej 2 000 mg/kg masy ciała/dzień, z zastosowaniem procedury opisanej dla tego badania, nie powoduje widocznych objawów toksycznych i jeżeli nie należałoby spodziewać się toksyczności na podstawie danych, dotyczących substancji strukturalnie pokrewnych, wtedy badanie z zastosowaniem większej dawki może nie być konieczne. Ten test graniczny stosowany jest z wyjątkiem przypadków, w których ekspozycja ludzi wskazuje na konieczność użycia wyższego poziomu dawki.

1.5.2.5. *Okres obserwacji*

Okres obserwacji powinien wynosić 21 dni.

1.5.3. **Procedura**

Po podaniu środka ochronnego, aby zapobiec śmierci z powodu ostrych skutków cholinergicznych, substancja testowana jest podawana w pojedynczej dawce.

1.5.3.1. Ogólne obserwacje

Obserwacje powinny rozpocząć się bezpośrednio po ekspozycji. Wszystkie kury powinny być starannie obserwowane kilka razy w ciągu pierwszych 2 dni i od tego czasu co najmniej raz dziennie przez okres 21 dni lub do zaplanowanego zabicia. Wszystkie oznaki toksyczności powinny być odnotowywane, w tym czas rozpoczęcia, typ, ostrość i czas trwania anomalii behawioralnych. Ataksja powinna być mierzona według porządkowej skali klasyfikacyjnej, składającej się z co najmniej czterech poziomów, paraliż powinien być odnotowany. Co najmniej dwa razy w tygodniu wszystkie kury wybrane do celów patologii powinny być wyjmowane z klatek i poddawane okresowej wymuszonej aktywności motorycznej, takiej jak wspinanie się po drabinie, aby ułatwić obserwację minimalnych skutków toksycznych. Zwierzęta konające oraz zwierzęta przejawiające ostre cierpienie i ból powinny być usuwane, gdy zostanie to zauważone, humanitarnie zabite i poddane sekcji zwłok.

▼B

1.5.3.2. Masa ciała

Wszystkie kury powinny być ważone tuż przed podaniem substancji testowanej i od tego czasu co najmniej raz w tygodniu.

1.5.3.3. Biochemia

Sześć losowo wybranych kur z grup badanych i z grupy kontroli nośnika, i trzy kury z pozytywnej grupy kontrolnej (jeżeli grupa ta jest poddawana badaniu jednocześnie) powinny być zabite w ciągu kilku dni po dawkowaniu, mózg i lędźwiowy rdzeń kręgowy powinien być przygotowany i poddany analizie aktywności zahamowania esterazy wywołującej neuropatię. Dodatkowo może być przydatne przygotowanie i poddanie tkanki nerwu kulszowego analizie aktywności zahamowania esterazy wywołującej neuropatię. Prawidłowo, trzy ptaki grupy kontrolnej i każdej grupy badanej są zabijane po 24 godzinach i trzy po 48 godzinach, podczas gdy trzy kury z pozytywnej grupy kontrolnej powinny być zabite po 24 godzinach. Jeżeli obserwacja klinicznych oznak zatrucia (często może to być ocenione przez obserwację czasu rozpoczęcia oznak cholinergicznych) wskazuje, że środek toksyczny może być usuwany bardzo powoli, bardziej pożądane może być pobranie próbki tkanki od trzech ptaków, w każdym z dwóch terminów między 24 a 72 godziną po dawkowaniu.

Analizy acetylocholinoesterazy (AChE) mogą być również wykonane na tych próbkach, jeżeli uzna się to za właściwe. Jednakże może mieć miejsce spontaniczna reaktywacja AChE *in vivo,* co może prowadzić do zbyt niskiego oszacowania potencji substancji jako inhibitora AChE.

1.5.3.4. Sekcja zwłok

Sekcja zwłok wszystkich zwierząt (zabitych planowo i zabitych jako konające) powinna obejmować obserwację wyglądu mózgu i rdzenia kręgowego.

1.5.3.5. Badanie histopatologiczne

Obojętna tkanka zwierząt przeżywających okres obserwacji, nieużyta w badaniach biochemicznych, powinna być poddana badaniu mikroskopowemu. Tkanki powinny być przygotowane *in situ,* stosując techniki perfuzji. Odcinki powinny obejmować móżdżek (środkowy – wzdłużny poziom), rdzeń przedłużony, rdzeń kręgowy i nerwy obwodowe. Odcinki rdzenia kręgowego powinny być pobrane z górnego segmentu karkowego, okolic środkowopiersiowych i lędźwiowo-krzyżowych. Powinny być pobrane odcinki z okolic obwodowych nerwu piszczelowego i jego odgałęzienia do mięśnia brzuchatego łydki oraz nerwu kulszowego. Odcinki powinny być zabarwione odpowiednią mieliną i barwnikami charakterystycznymi dla aksonów.

2. **DANE**

Negatywne wyniki w punktach końcowych wybranych w tej metodzie (biochemia, histopatologia i obserwacja behawioralna) prawidłowo nie wymagałyby dalszego badania, dotyczącego opóźnionej neurotoksyczności. Niejednoznaczne lub nieprzekonujące wyniki dla tych punktów końcowych mogą wymagać dalszej oceny.

Powinny zostać dostarczone indywidualne zwierząt. Dodatkowo, wszystkie dane powinny być podsumowane w formie tabeli, przedstawiając dla każdej grupy badanej liczbę zwierząt na początku testu, liczbę zwierząt wykazujących zmiany patologiczne, skutki behawioralne i biochemiczne, typy i ostrość tych zmian patologicznych lub skutków i procent zwierząt okazujących każdy typ i ostrość zmiany patologicznej lub skutku.

▼B

Wyniki badania powinny być ocenione pod względem częstotliwości, ostrości, i korelacji skutków behawioralnych, biochemicznych i histopatologicznych oraz jakichkolwiek innych obserwowanych w grupach badanych i kontrolnych.

Wyniki liczbowe powinny być ocenione z zastosowaniem odpowiedniej i ogólnie akceptowanej metody statystycznej. Metody statystyczne powinny być wybrane podczas planowania badania.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

SPRAWOZDANIE Z TESTU

Sprawozdanie z testu obejmuje, jeżeli możliwe, następujące informacje:

Zwierzęta badane:

— wykorzystana rasa,

— liczba i wiek zwierząt,

— źródło, warunki przebywania zwierząt itp.,

— indywidualna waga zwierząt na początku testu.

Warunki testu:

— szczegóły dotyczące przygotowania substancji testowanej, trwałości i homogeniczności, w odpowiednich przypadkach,

— uzasadnienie wyboru nośnika,

— szczegóły podawania substancji testowanej,

— szczegóły jakości pożywienia i wody,

— racjonalna podstawa wyboru dawki,

— parametry podawanych dawek, w tym dane szczegółowe dotyczące nośnika, objętości i formy fizycznej podawanych substancji,

— tożsamość i szczegóły podawania jakiegokolwiek środka ochronnego.

Wyniki:

— dane dotyczące masy ciała,

— dane dotyczące reakcji toksycznej według grup, w tym śmiertelność,

— natura, ostrość i czas trwania obserwacji klinicznych (czy odwracalne czy nie),

— szczegółowy opis metod biochemicznych i wyników,

— wyniki sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników histopatologicznych,

— gdzie właściwe, statystyczna obróbka wyników.

Rozpatrzenie wyników

Wnioski.

4. **BIBLIOGRAFIA**

Niniejsza metoda jest analogiczna do OECD TG 418.

▼B

B.38. **OPÓŹNIONA NEUROTOKSYCZNOŚĆ SUBSTANCJI FOSFOROORGANICZNYCH. 28-DNIOWE BADANIE WIELOKROTNEJ DAWKI**

1. **METODA**

1.1. WPROWADZENIE

Przy ocenie i oszacowaniu skutków toksycznych substancji ważne jest rozważenie potencjału niektórych klas substancji do wywoływania określonych typów neurotoksyczności, które mogą nie być wykrywane podczas innych badań toksyczności. Zaobserwowano, że niektóre substancje fosforoorganiczne powodują opóźnioną neurotoksyczność i powinny być wzięte pod uwagę jako związki, które mogą być zaliczone do oszacowania.

Testy sortujące *in vitro* mogłyby być zastosowane w celu rozpoznania tych substancji, które mogą powodować opóźnioną polineuropatię; jednakże negatywne wyniki badań *in vitro* nie są dowodem na to, że substancja testowana nie jest substancją neurotoksyczną.

Ten 28-dniowy test opóźnionej neurotoksyczności dostarcza informacji, dotyczących możliwych zagrożeń zdrowia, które mogą się pojawiać się pod wpływem wielokrotnych ekspozycji przez ograniczony okres czasu. Dostarczy on informacji dotyczących reakcji na dawkę i może zapewnić oszacowanie poziomu braku obserwowanych niekorzystnych skutków, który może być przydatny przy ustalaniu kryteriów bezpieczeństwa dla ekspozycji.

Zob. także Wprowadzenie ogólne część B.

1.2. DEFINICJE

Substancje fosforoorganiczne obejmują nienaładowane estry fosforoorganiczne, tioestry i bezwodniki pochodnych organicznych kwasu fosforowego(V), kwasu fosfonowego i kwasów fosforoamidowych i ich tio-pochodnych lub inne substancje, które mogą wywoływać opóźnioną neurotoksyczność obserwowaną czasami w tej klasie substancji.

Opóźniona neurotoksyczność jest objawem związanym z przedłużonym zwłocznym początkiem ataksji, obwodową aksonopatią w rdzeniu kręgowym i nerwach obwodowych, i zahamowaniem i starzeniem esterazy wywołującej neuropatię (NTE) w obojętnej tkance.

1.3. ZASADA METODY BADANIA

Dzienne dawki substancji testowanej są podawane domowym kurom doustnie przez 28 dni. Zwierzęta są obserwowane co najmniej raz dziennie pod kątem anomalii behawioralnych, ataksji i paraliżu do 14 dnia po ostatniej dawce. Przeprowadzane są pomiary biochemiczne, w szczególności zahamowanie esterazy wywołującej neuropatię (NTE), na kurach losowo wybranych z każdej grupy, prawidłowo 24 i 48 godzin po ostatniej dawce. Dwa tygodnie po ostatniej dawce pozostałe kury są zabijane i przeprowadzane jest badanie histopatologiczne wybranych obojętnych tkanek.

▼B

1.4. OPIS METODY BADANIA

1.4.1. **Przygotowania**

Zdrowe, młode, dorosłe kury, wolne od kolidujących chorób wirusowych i leków oraz bez nieprawidłowości w sposobie chodzenia, powinny zostać losowo przydzielone do grupy badanej i kontrolnej oraz aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania.

Powinny być stosowane klatki i zagrody wystarczająco obszerne, aby umożliwić swobodne poruszanie się kur i niezakłóconą obserwację sposobu chodzenia.

Dawkowanie doustne powinno być prowadzone każdego dnia, 7 dni w tygodniu, najlepiej stosując aplikowanie bezpośrednio do żołądka lub w kapsułkach żelatynowych. Ciecze powinny być podawane nierozcieńczone lub rozpuszczone w odpowiednim nośniku, takim jak olej kukurydziany; substancje stałe powinny być w miarę możliwości rozpuszczone, ponieważ duże dawki substancji stałych w kapsułkach żelatynowych mogą nie być absorbowane wydajnie. W przypadku nośników niewodnych powinna być znana charakterystyka toksyczna nośnika, a jeżeli nie jest znana, powinna być określona przed testem.

1.4.2. **Warunki testu**

1.4.2.1. *Badane zwierzęta*

Zalecana jest młoda, dorosła, domowa, kura nioska (*Gallus gallus domesticus*), w wieku 8–12 miesięcy. Wykorzystane powinny być odmiany i rasy standardowej wielkości, które prawidłowo powinny być wcześniej hodowane w warunkach umożliwiających swobodne poruszanie się.

1.4.2.2. *Liczba i płeć*

Zasadniczo, powinny być wykorzystane co najmniej trzy grupy badane i grupa kontrolna nośnika. Grupa kontrolna nośnika powinna być traktowana w sposób identyczny jak grupa badana z wyjątkiem tego, że podawanie substancji testowanej jest pominięte.

W każdej grupie ptaków należy wykorzystać wystarczającą liczbę kur, tak aby co najmniej sześć ptaków można było zabić do celów oznaczeń biochemicznych (trzy w każdym z dwóch punktów czasowych) i aby po zakończeniu działań badawczych sześć kur mogło przeżyć okres 14-dniowej obserwacji do celów patologii.

1.4.2.3. *Poziomy dawki*

Poziomy dawki powinny być wybierane, biorąc pod uwagę trzy wyniki testu ostrej opóźnionej neurotoksyczności i jakiekolwiek inne istniejące, osiągalne dane dotyczące toksyczności i kinetyki testowanego związku. Powinien być wybrany najwyższy poziom dawki w celu wywołania objawów zatrucia, najlepiej opóźnionej neurotoksyczności, ale nie śmierci lub widocznego cierpienia. Od tego czasu powinna być dobrana malejąca sekwencja poziomów dawki, w celu wykazania wszystkich reakcji powiązanych z dawkowaniem i braku zaobserwowania niekorzystnych objawów przy najmniejszym poziomie dawki.

▼B

1.4.2.4. *Test graniczny*

Jeżeli test przy poziomie dawki wynoszącym co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała/dzień, z zastosowaniem procedury opisanej dla tego badania, nie wywołuje widocznych objawów toksycznych i jeżeli nie należałoby spodziewać się toksyczności na podstawie danych, dotyczących substancji strukturalnie pokrewnych, to badanie z zastosowaniem większej dawki może nie być konieczne. Ten test graniczny stosuje się z wyjątkiem przypadków, w których spodziewana ekspozycja ludzi wskazuje na konieczność użycia wyższego poziomu dawki.

1.4.2.5. *Okres obserwacji*

Wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane co najmniej raz dziennie podczas okresu ekspozycji i 14 dni po nim, chyba że planowana jest sekcja zwłok.

1.4.3. **Procedura**

Substancja testowana jest dawkowana siedem dni w tygodniu przez okres 28 dni

1.4.3.1. *Ogólne obserwacje*

Obserwacje powinny rozpocząć się bezpośrednio po rozpoczęciu działań badawczych. Wszystkie kury powinny być starannie obserwowane co najmniej raz dziennie w każdym z 28 dni terapii i przez 14 dni po dawkowaniu lub do zaplanowanego zabicia. Wszystkie oznaki toksyczności powinny być odnotowane, w tym czas rozpoczęcia, typ, ostrość i czas trwania. Obserwacje powinny uwzględniać anomalie behawioralne, ale nie powinny być do nich ograniczone. Ataksja powinna być mierzona na porządkowej skali klasyfikacyjnej składającej się z co najmniej czterech poziomów, należy odnotować paraliż. Co najmniej dwa razy w tygodniu kury powinny być wyjęte z klatek i poddane okresowej wymuszonej aktywności motorycznej, takiej jak wspinanie się po drabinie, w celu ułatwienia obserwacji minimalnych skutków toksycznych. Zwierzęta konające, przejawiające ostre cierpienie i ból powinny być usuwane, gdy zostanie to zauważone, humanitarnie zabite i poddane sekcji zwłok.

1.4.3.2. *Masa ciała*

Wszystkie kury powinny być ważone tuż przed pierwszym podaniem substancji testowanej i od tego czasu co najmniej raz w tygodniu.

1.4.3.3. *Biochemia*

Sześć losowo wybranych kur z grup badanych i z grupy kontroli nośnika powinno zostać zabitych w ciągu kilku dni od przyjęcia ostatniej dawki. Mózg i lędźwiowy rdzeń kręgowy powinien być przygotowany i poddany analizie aktywności zahamowania esterazy (NTE) wywołującej neuropatię. Dodatkowo może być przydatne przygotowanie i poddanie tkanki nerwu kulszowego analizie aktywności zahamowania esterazy wywołującej neuropatię. Prawidłowo, trzy ptaki grupy kontrolnej i każdej grupy badanej są zabijane po 24 godzinach i trzy po 48 godzinach od ostatniej dawki. Jeżeli dane z badania ostrej toksyczności lub innych badań (np. toksykokinetycznych) wskazują, że inne terminy zabijania po końcowym dawkowaniu są bardziej pożądane niż podane, powinny być one zastosowane, a racjonalna podstawa udokumentowana.

Analizy acetylocholinoesterazy (AChE) mogą być również wykonane na tych próbkach, jeżeli jest to uznane za właściwe. Jednakże może mieć miejsce spontaniczna reaktywacja AChE *in vivo* i w efekcie prowadzić do zbyt niskiego oszacowania potencjału substancji jako inhibitora AChE.

▼B

1.4.3.4. *Sekcja zwłok*

Sekcja zwłok wszystkich zwierząt (zabitych planowo i zabitych jako konające) powinna obejmować obserwację wyglądu mózgu i rdzenia kręgowego.

1.4.3.5. *Badanie histopatologiczne*

Obojętna tkanka zwierząt przeżywających okres obserwacji, nie użyta w badaniach biochemicznych powinna być poddana badaniu mikroskopowemu. Tkanki powinny być przygotowane *in situ,* stosując techniki perfuzji. Odcinki powinny obejmować móżdżek (środkowy – wzdłużny poziom), rdzeń przedłużony, rdzeń kręgowy, i nerwy obwodowe. Odcinki rdzenia kręgowego powinny być pobrane z górnego segmentu karku, okolic środkowopiersiowych i lędźwiowo-krzyżowych. Powinny być pobrane odcinki z okolic obwodowych nerwu piszczelowego i jego odgałęzienia do mięśnia brzuchatego łydki oraz nerwu kulszowego. Odcinki powinny być zabarwione odpowiednią mieliną i barwnikami charakterystycznymi dla aksonów. Początkowo badanie mikroskopowe powinno być przeprowadzone na zakonserwowanych tkankach wszystkich zwierząt grupy kontrolnej i grupy wysokiej dawki. W przypadku gdy istnieją dowody skutków w grupie wysokiej dawki, badanie mikroskopowe powinno być również przeprowadzone na kurach z grup niskiej i pośredniej dawki.

2. **DANE**

Negatywne wyniki w punktach końcowych wybranych w tej metodzie (biochemia, histopatologia i obserwacja behawioralna) prawidłowo nie wymagałyby dalszego badania, dotyczącego opóźnionej neurotoksyczności. Niejednoznaczne lub nieprzekonujące wyniki dla tych punktów końcowych mogą wymagać dalszej oceny.

Powinny zostać dostarczone dane indywidualne zwierząt. Dodatkowo wszystkie dane powinny być podsumowane w formie tabeli, przedstawiając dla każdej grupy badanej liczbę zwierząt na początku testu, liczbę zwierząt wykazujących zmiany patologiczne, skutki behawioralne i biochemiczne, typy i ostrość tych zmian patologicznych lub skutków oraz procent zwierząt okazujących każdy typ i ostrość zmiany patologicznej lub skutku.

Wyniki badania powinny być ocenione pod względem częstotliwości, ostrości, i korelacji skutków behawioralnych, biochemicznych i histopatologicznych oraz jakichkolwiek innych obserwowanych w każdej z grup badanych i kontrolnych.

Wyniki liczbowe powinny być ocenione za pomocą odpowiedniej i ogólnie akceptowanej metody statystycznej. Metody statystyczne powinny być wybrane podczas planowania badania.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

SPRAWOZDANIE Z TESTU

Sprawozdanie z testu obejmuje, jeżeli możliwe, następujące informacje:

Zwierzęta badane:

— wykorzystana rasa,

— liczba i wiek zwierząt,

— źródło, warunki, w których przebywają zwierzęta itp.,

— indywidualna waga zwierząt na początku testu.

▼B

Warunki testu:

— szczegóły dotyczące przygotowania substancji testowanej, trwałości i homogeniczności; w odpowiednich przypadkach,

— uzasadnienie wyboru nośnika,

— szczegóły podawania substancji testowanej,

— szczegóły jakości pożywienia i wody,

— racjonalna podstawa wyboru dawki,

— parametry podawanych dawek, w tym szczegóły dotyczące nośnika, objętości i formy fizycznej podawanych materiałów,

— racjonalna podstawa wyboru innych terminów oznaczenia biochemicznego, jeżeli są one inne niż 24 i 48 h.

Wyniki:

— dane dotyczące masy ciała,

— dane dotyczące reakcji toksycznej według grupy,

— w tym śmiertelność,

— natura, ostrość i czas trwania obserwacji klinicznych (czy odwracalne, czy nie),

— szczegółowy opis metod biochemicznych i wyników,

— wyniki sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników histopatologicznych,

— statystyczna obróbka wyników, gdzie jest to właściwe.

Rozpatrzenie wyników.

Wnioski.

4. **BIBLIOGRAFIA**

Niniejsza metoda jest analogiczna do OECD TG 419.

▼B

B.39. TEST POREPERACYJNEJ SYNTEZY DNA Z KOMÓRKAMI WĄTROBY SSAKÓW *IN VIVO*

1. METODA

Metoda ta jest powtórzeniem OECD TG 486, testu poreperacyjnej syntezy DNA z komórkami wątroby ssaków *in vivo* (1997).

1.1. WPROWADZENIE

Celem testu poreperacyjnej syntezy DNA z komórkami wątroby ssaków *in vivo* (UDS) jest zidentyfikowanie substancji badanych, które wywołują naprawę DNA w komórkach wątroby lub u zwierząt poddanych działaniu substancji (1)(2)(3)(4).

To badanie *in vivo* przewiduje metodę wykrywania skutków genotoksycznych substancji chemicznej w wątrobie. Zmierzony punkt końcowy jest wskaźnikiem uszkodzenia DNA oraz dalszych napraw w komórkach wątroby. Wątroba jest zazwyczaj głównym miejscem, gdzie odbywa się przemiana materii wchłanianych związków. Jest zatem właściwym miejscem pomiarów uszkodzenia DNA *in vivo*.

Jeżeli istnieją dowody na to, że substancja nie dotrze do tkanek docelowych, wykorzystanie tego badania nie jest właściwe.

Punkt końcowy testu poreperacyjnej syntezy DNA z komórkami wątroby ssaków *in vivo* mierzony jest przez oznaczenie poboru oznaczonych nukleozydów w komórkach, które nie są poddawane syntezie białka (faza S). Najpowszechniej wykorzystywaną techniką jest oznaczanie poboru wykorzystanej oznaczonej trytem tymidyny (^{3}H-TdR) przez autoradiografię. Preferuje się wykorzystywanie wątroby szczurów do przeprowadzenia badań *in vivo* UDS. Tkanki inne niż wątrobowe mogą zostać wykorzystane, ale nie podlegają one tej metodzie.

Wykrycie reakcji UDS uzależnione jest od ilości zasad DNA usuniętych i zastąpionych w miejscu uszkodzenia. Z tego względu badanie UDS ma szczególną wartość w odniesieniu do wykrywania wywołanych przez substancję napraw (20–30 zasad). Odwrotnie, „reperacja krótkich fragmentów DNA" (jedna do trzech zasad) jest wykrywana ze znacznie mniejszą czułością. Co więcej, zdarzenia mutagenne mogą wynikać ze względu na nienaprawienie, niewłaściwą naprawę, niewłaściwe zastąpienie defektów DNA. Zakres reakcji UDS nie zawiera wskazania dokładności procesu naprawy. Dodatkowo możliwe jest, że mutagen reaguje z DNA, ale uszkodzenie DNA nie jest naprawione poprzez wycinek procesu naprawczego. Brak szczegółowych informacji dotyczących aktywności mutagennej dostarczonych przez badanie UDS jest wyrównywane przez potencjał wrażliwości tego punktu końcowego, ponieważ jest on mierzony w całym genomie.

Zob. także Ogólne wprowadzenie do części B.

1.2. DEFINICJE

Komórki w naprawie: względna ilość ziarnistości jądrowych (NNG) wyższa niż aktualna wartość, która ma zostać uzasadniona w laboratorium, w którym przeprowadzane są badania.

Względna ilość ziarnistości jądrowych (NNG): miara ilościowa w odniesieniu do aktywności UDS komórek w testach autoradiograficznych UDS, obliczona przez odejmowanie średniej ilości jąder cytoplazmowych w obszarach cytoplazmowych równoważnych jądru (CG) od ilości ziarnistości jądrowych (NG): NNG = NG – CG. NNG obliczeń dokonuje się dla poszczególnych komórek, a następnie łączy się dla komórek w ramach danej hodowli, w równoległych hodowlach itd.

▼B

Test poreperacyjnej syntezy DNA (UDS): synteza reperacyjna DNA po wycięciu oraz usunięciu części DNA zawierającej region uszkodzenia wywołanego substancjami chemicznymi lub czynnikami fizycznymi.

1.3. ZASAD METODY BADAWCZEJ

Badanie UDS na komórkach wątroby ssaków wskazuje syntezę naprawczą DNA po wycięciu oraz usunięciu odcinka DNA zawierającego region uszkodzenia wywołanego substancjami chemicznymi lub czynnikami fizycznymi. Badanie zazwyczaj opiera się na włączeniu ^{3}H-TdR do DNA komórek wątroby, które posiadają niską częstotliwość komórek w fazie S cyklu komórkowego. Pobór ^{3}H-TdR zazwyczaj jest oznaczany przez auroradiografię, ze względu na to, że ta technika nie jest tak podatna na zakłócenie przez komórki fazy S jak na przykład płynne podliczanie scyntalizacji.

1.4. OPIS METODY

1.4.1. **Preparaty**

1.4.1.1. *Wybór gatunków zwierząt*

Powszechnie wykorzystywane są szczury, chociaż każdy odpowiedni gatunek ssaków może zostać wykorzystany. Powszechnie wykorzystywane szczepy laboratoryjne młodych, zdrowych dojrzałych zwierząt powinny zostać wykorzystane. W trakcie przeprowadzania badania, zmienność masy zwierząt powinno być minimalne oraz nie powinno przekraczać ± 20 % średniej masy dla każdej z płci.

1.4.1.2. *Warunki przetrzymywania oraz karmienia*

Ogólne warunki określone w Ogólnym wprowadzeniu do części B są stosowane, chociaż celem w odniesieniu do wilgotności powinien być poziom 50–60 %.

1.4.1.3. *Przygotowanie zwierząt*

Zdrowe młode dorosłe osobniki zwierząt są losowo przypisane do grup kontrolnych oraz grup poddanych działaniu substancji. Klatki powinny zostać przygotowane w sposób minimalizujący możliwe skutki negatywne wynikające z umieszczenia w klatce. Zwierzęta są identyfikowane oraz aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przynajmniej przez okres pięciu dni.

1.4.1.4. *Substancja badana/przygotowanie*

Stała substancja badana powinna zostać rozpuszczona lub zawieszona w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczona, jeżeli jest to odpowiednie przed dawkowaniem zwierzętom. Płynne substancje mogą być dawkowane bezpośrednio lub rozcieńczane przed dawkowaniem. Powinny zostać wykorzystane świeżo przygotowywane substancje, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, iż dopuszczalne jest składowanie substancji

1.4.2. **Warunki badania**

1.4.2.1. *Rozpuszczalnik/nośnik*

Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien wywoływać skutków toksycznych przy wykorzystanym poziomie dawek oraz w odniesieniu do niego nie powinno być spodziewane reagowanie chemiczne z substancją badaną. Jeśli inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki są wykorzystywane, ich włączenie do doświadczenia powinno być wsparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników.

▼B

1.4.2.2. *Kontrole*

Równoległe pozytywne oraz negatywne kontrole (rozpuszczalnik/nośnik) powinny zostać objęte każdą, niezależnie przeprowadzaną częścią doświadczenia. Z wyjątkiem poddawania działaniu substancji badanej, zwierzęta w grupie kontrolnej powinny być poddawane działaniom w identyczny sposób, jak zwierzęta w grupach poddanych działaniu substancji.

Pozytywnymi kontrolami powinny być substancje znane z wytwarzania UDS, jeżeli są podawane przy poziomie poddania działaniu substancji, w odniesieniu do którego oczekuje się, iż da wykrywalny wzrost powyżej tła. Pozytywne kontrole, potrzebujące aktywacji metabolicznej powinny być wykorzystywane, jeżeli są podawane przy dawkach wywołujących umiarkowane reakcje (4). Dawki mogą zostać wybrane tak, aby skutki były jasne, ale aby nie ujawniały natychmiast badającemu tożsamości zakodowanych szkiełek mikroskopowych. Przykładami pozytywnych substancji kontrolnych są:

Okresy pobierania próbek	Substancje	Nr CAS	Nr Einecs
Wczesne okresy pobierania próbek (2–4 godzin)	N-nitrozodimetyloamina	62-75-9	200-249-8
Późne okresy pobierania próbek (12-16 godzin)	N-2-fluorenyloacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Inne odpowiednie kontrolne substancje chemiczne mogą zostać wykorzystane. Dopuszczalne jest, by pozytywne kontrole były podawane drogą inną niż substancja badana.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Liczba oraz płeć zwierząt**

Powinna zostać wykorzystana odpowiednia liczba zwierząt w celu uwzględnienia naturalnej biologicznej zmienności reakcji. Liczba zwierząt powinna przynajmniej stanowić trzy nadające się do poddania analizie osobniki na grupę. W przypadku gdy została zgromadzona znacząca baza danych, jedynie jedno zwierzę lub dwa zwierzęta są wymagane w odniesieniu do równoległych negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych.

Jeżeli w trakcie badania istnieją dostępne dane z badań dotyczących tego samego gatunku, wykorzystując tę samą drogę poddania działaniu substancji, które wskazują, że nie istnieją zasadnicze różnice w toksyczności między płciami, badanie jednej płci będzie wystarczające. W przypadku poddawania człowieka działaniu substancji, badanie może być specyficzne co do płci, tak jak na przykład w odniesieniu do niektórych środków farmaceutycznych, badanie powinno zostać przeprowadzone z udziałem zwierząt odpowiedniej płci.

1.5.2. **Harmonogram poddania działaniu substancji**

Substancje badane są w ujęciu ogólnym podawane jako pojedynczy zabieg poddania działaniu substancji.

1.5.3. **Poziomy dawek**

Zazwyczaj wykorzystywane są przynajmniej dwa poziomy dawek. Najwyższa dawka jest określona jako dawka wywołująca oznaki toksyczności a wyższe poziomy dawek oparte na tym samym reżimie dawkowania mogłyby być zabójcze. Ogólnie niższa dawka powinna wynosić od 50 % do 25 % wysokiej dawki.

▼B

Substancje o szczególnej aktywności biologicznej przy niskich nietoksycznych dawkach (takie jak hormony i mitogeny) mogą stanowić wyjątek w odniesieniu do kryteriów ustalania dawki i powinny być oceniane na zasadzie jednostkowych przypadków. Jeżeli przeprowadzane jest studium określające zakres badania, powinno być ono przeprowadzone w tym samym laboratorium, wykorzystując ten sam reżim gatunku, szczepu, płci oraz poddawania działaniu substancji, który ma zostać wykorzystany w badaniu głównym.

Najwyższa dawka może być również określona jako dawka, która wywołuje pewne wskazania toksyczności w wątrobie (np. jądrze piknotycznym).

1.5.4. **Badanie ograniczone**

Jeżeli badanie w oparciu o jeden poziom dawek o przynajmniej 2 000 mg/kg masy ciała zastosowane w pojedynczym poddaniu działaniu substancji lub jako dwa zabiegi poddania działaniu substancji tego samego dnia, nie daje dostrzegalnych wyników toksycznych, oraz jeżeli nie podejrzewa się genotoksyczności w oparciu o dane dotyczące substancji powiązanych strukturalnie, wówczas przeprowadzenie pełnego badania może nie być konieczne. Spodziewa się, iż poddanie człowieka działaniu substancji może wykazać potrzebę wykorzystania większej dawki w badaniu ograniczonym.

1.5.5. **Dawkowanie**

Substancja badana jest zazwyczaj podawana przez zgłębnik żołądkowy lub odpowiednią rurkę intubacyjną. Inne drogi poddania działaniu substancji mogą być dopuszczalne w przypadku gdy ich wykorzystanie jest uzasadnione. Jednakże droga wewnątrzotrzewnowa nie jest zalecana ze względu na to, że mogłaby poddać wątrobę bezpośrednio działaniu substancji badanej, co jest bardziej prawdopodobne niż w przypadku poddania działaniu substancji przez krwiobieg. Maksymalna objętość płynu, jaka może być podana przez zgłębnik lub wstrzyknięta jednorazowo zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość nie powinna przekraczać 2 ml/100 g masy ciała. Wykorzystanie objętości wyższych niż te musi być uzasadnione. Z wyjątkiem podrażniających lub żrących substancji, które zazwyczaj ujawniają zwiększone skutki o dużym stężeniu, zmienności w objętości substancji badanej powinny zostać zminimalizowane przez dostosowanie stężenia w celu zapewnienia stałej objętości przy wszystkich poziomach dawek.

1.5.6. **Przygotowanie komórek wątroby**

Komórki wątroby przygotowywane są z poddanych działaniu substancji zwierząt zazwyczaj w 12–16 godzin po dawkowaniu. Dodatkowy wcześniejszy okres pobierania próbek (zazwyczaj 2–4 godzin po poddaniu działaniu substancji) jest generalnie niezbędny, chyba że istnieje jasna pozytywna reakcja przy 12–16 godzinach. Jednakże alternatywne okresy pobierania próbek mogą być wykorzystane, jeżeli są uzasadnione na podstawie danych toksykokinetycznych.

Krótkookresowe hodowle komórek wątrobowych ssaków są zazwyczaj ustanawiane przez przecedzanie wątroby *in situ* z kolagenazą i pozwalając na przytwierdzenie świeżo dysocjowanych komórek wątroby do odpowiedniej powierzchni. Komórki wątroby ze zwierząt kontroli negatywnych powinny posiadać zdolność do życia (5) wynoszącą przynajmniej 50 %.

1.5.7. **Oznaczanie UDS**

Świeżo oddzielone komórki wątroby ssaków są inkubowane zazwyczaj w podłożu zawierającym ^{3}H-TdR przez odpowiedni okres czasu, np. 3–8 godzin. Na koniec okresu inkubacji podłoże powinno zostać usunięte od komórek, które mogą następnie być inkubowane w podłożu zawierającym nadmiar nieoznaczonej tymidyny w celu zmniejszenia niewłączonej radioaktywności („zimny obieg”). Następnie komórki są płukane, stabilizowane oraz suszone. W odniesieniu do okresów inkubacji bardziej przedłużonych w czasie zimny obieg może nie być konieczny. Szkiełka mikroskopowe są zanurzane w emulsji autoradiograficznej, poddawane działaniu substancji w ciemności (np. przetrzymywane w lodówce przez 7–14 dni), wytwarzane, barwione, a srebrne ziarna są podliczane. Przygotowywane są dwa lub trzy szkiełka mikroskopowe dla każdego zwierzęcia.

▼B

1.5.8. **Analiza**

Preparaty szkiełek mikroskopowych powinny zawierać wystarczającą liczbę komórek o normalnej morfologii w celu umożliwienia przeprowadzenia mającej znaczenie oceny UDS. Preparaty są badane mikroskopowo pod kątem oznak jawnej cytotoksyczności (np. pyknoza, zmniejszony poziom oznaczenia radioaktywności).

Szkiełka mikroskopowe powinny być kodowane przed podliczeniem ziaren. Zazwyczaj 100 komórek jest ocenianych z każdego zwierzęcia, z przynajmniej dwu szkiełek mikroskopowych; ocena mniejszej ilości niż 100 komórek/zwierzę powinna zostać uzasadniona. Ilości ziaren nie są oceniane punktowo w odniesieniu do S-fazy jądra, ale udział komórek S-fazy może zostać odnotowany.

Ilość włączenia ^{3}H-TdR w jądrze oraz cytoplazmy normalnych pod względem morfologii komórek, jak potwierdzono przez osadzanie się srebrnych ziaren, powinna być oznaczona odpowiednią metodą.

2. **DANE**

2.1. PRZETWARZANIE WYNIKÓW

Powinny zostać dostarczone indywidualne szkiełka mikroskopowe oraz dane dotyczące zwierzęcia. dodatkowo wszystkie dane powinny zostać podsumowane w formie tabelarycznej. Względna ilość ziarnistości jądrowych (NNG) powinna zostać obliczona dla każdej komórki, dla każdego zwierzęcia oraz dla każdej dawki oraz czasu przez odjęcie ilości CG od ilości ziarnistości jądrowych (NG). Jeśli „komórki w naprawie" są podliczane, kryteria oznaczania „komórek w naprawie" powinny zostać uzasadnione oraz oparte na historycznych danych dotyczących kontroli negatywnej lub danych dotyczących równoległej kontroli negatywnej. Wyniki liczbowe mogą być ocenione z wykorzystaniem metod statystycznych. Jeżeli są wykorzystywane, badania statystyczne powinny zostać wybrane oraz uzasadnione przed przeprowadzeniem badania.

2.2. OCENA ORAZ INTERPRETACJA WYNIKÓW

Przykłady kryteriów w odniesieniu do pozytywnych/negatywnych reakcji obejmują:

pozytywne
- (i) wartości NNG powyżej istniejącego progu, który jest uzasadniony na podstawie historycznych danych laboratoryjnych; lub
- (ii) wartości NNG znacząco wyższe w porównaniu z równoległą kontrolą;

negatywne
- (i) wartości NNG w zakresie poniżej historycznego progu kontrolnego; lub
- (ii) wartości NNG nieznacznie wyższe w porównaniu z równoległą kontrolą.

▼B

Biologiczne znaczenie danych powinno zostać wzięte pod uwagę, np. parametry takie jak: zmienność międzyzwierzęca, relacja między dawką, a reakcją oraz cytotoksyczność powinny zostać uwzględnione. Metody statystyczne mogą być wykorzystane jako metody pomocnicze w ocenie wyników badania. Jednakże znaczenie statystyczne nie powinno być jedynym czynnikiem określającym w odniesieniu do reakcji pozytywnej.

Chociaż większość doświadczeń będzie dawało w jasny sposób pozytywne lub negatywne wyniki, w rzadkich przypadkach zestaw danych będzie uniemożliwiał dokonanie ostatecznej oceny dotyczącej aktywności substancji badanej. Wyniki mogą pozostać niejednoznaczne lub sporne niezależnie od tego, ile razy doświadczenie było powtarzane.

Wyniki pozytywne z testu UDS z komórkami wątroby ssaków *in vivo* wskazują, że substancja badana wywołuje uszkodzenia DNA w komórkach wątroby ssaków *in vivo,* które mogą zostać naprawione w drodze testu poreperacyjnej syntezy DNA *in vitro*. Wyniki negatywne wskazują, że w warunkach badawczych, badana substancja nie wywołuje uszkodzeń DNA, które są wykrywane przez to badanie.

Prawdopodobieństwo, że substancja badana dociera do głównego obiegu lub szczególnie do tkanki docelowej (np. toksyczność systemowa) powinno zostać omówione.

3. **SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Rozpuszczalnik/nośnik:

— uzasadnienie wyboru nośnika,

— rozpuszczalność oraz stabilność substancji w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli jest znana.

Badane zwierzęta:

— wykorzystane gatunki/szczepy,

— liczba oraz wiek zwierząt,

— źródło, warunki przetrzymywania, odżywianie itp.,

— indywidualna masa ciała zwierzęcia na początku badania, w tym zakres masy ciała, średnie oraz stan dardowe odstępstwa w odniesieniu do każdej z grup.

Warunki badania:

— pozytywne i negatywne nośnik/rozpuszczalnik kontrole,

— dane dotyczące studium określającego zakres badania, jeżeli zostało przeprowadzone,

— racjonalne uzasadnienie wyboru poziomu dawek,

— szczegóły dotyczące preparatu substancji badanej,

— szczegóły dotyczące podawania substancji badanej,

— szczegóły dotyczące drogi podawania substancji badanej,

— metody sprawdzania, czy dany czynnik badany dotarł do ogólnego obiegu lub tkanki docelowej, jeżeli ma zastosowanie,

▼B

— zmiana stężenia substancji badanej w odżywianiu/wodzie pitnej (ppm) na rzeczywistą dawkę (mg/kg masy ciała/dzień), jeżeli ma zastosowanie,

— szczegóły dotyczące jakości wody oraz żywności,

— szczegółowy opis poddania działaniu substancji oraz harmonogramów pobierania próbek,

— metody pomiaru toksyczności,

— metoda przygotowania i hodowli komórek wątroby,

— wykorzystana technika autoradiograficzna,

— liczba sporządzonych szkiełek mikroskopowych oraz liczba ocenionych komórek,

— kryteria oceny,

— kryteria uznawania badania za pozytywne, negatywne lub niejednoznaczne.

Wyniki:

— poszczególne szkiełka mikroskopowe, zwierzęta i grupy, średnie wartości ziarnistości jądrowych, ziarnistości cytoplazmowych oraz względna ziarnistość jądrowa,

— relacja miedzy dawką a reakcją, jeżeli jest dostępna,

— ocena statystyczna, jeżeli istnieje,

— oznaki toksyczności,

— dane dotyczące równoległych negatywnych (rozpuszczalnik/nośnik) oraz pozytywnych kontroli,

— historyczne dane dotyczące negatywnej (rozpuszczalnik/nośnik) oraz pozytywnej kontroli z zakresem, średnimi oraz standardowymi odchyleniami,

— liczba „komórek w naprawie”, jeżeli jest oznaczona,

— liczba komórek S-fazy, jeżeli jest oznaczona,

— zdolność komórek do życia.

Omówienie wyników.

Wnioski.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(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, pp. 1–18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (19 8 7), A Protocol and Guide for the *In vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 189, pp. 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, pp. 52–77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrac, U., Brambilla. G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (19 9 3), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In vitro* and In vivo, Mutation Res., 312, pp. 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, pp. 21–27.

(6) Mirsalis, J. C, Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In vivo/In vitro* Hepalocyte DNA Repair Assay, Environ. Mutagen, 4, pp. 553–562.

▼M8

B.40. **BADANIE DZIAŁANIA ŻRĄCEGO NA SKÓRĘ METODĄ *IN VITRO*: TEST PRZEZSKÓRNEJ OPORNOŚCI ELEKTRYCZNEJ**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 430 (2015). Działanie żrące na skórę oznacza powstawanie nieodwracalnych uszkodzeń skóry, które przejawiają się jako widoczna martwica naskórka i skóry, w wyniku naniesienia na skórę substancji badanej [zgodnie z definicją Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ) (1) i z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP) ([1])]. Niniejsza zaktualizowana metoda badawcza B.40 obejmuje procedurę *in vitro* umożliwiającą identyfikację substancji i mieszanin mających działanie żrące i nie mających takiego działania zgodnie z GHS ONZ (1) oraz rozporządzeniem CLP.

2. Ocena działania żrącego na skórę wiązała się zwykle z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych (metoda badawcza B.4 równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 404 pierwotnie przyjętej w 1981 r. i zmienionej w latach 1992, 2002 i 2015) (2). Poza obecną metodą badawczą B.40 zweryfikowano i przyjęto inne metody badawcze *in vitro* służące badaniu potencjalnego działania żrącego na skórę substancji chemicznych jako metodę badawczą B.40bis (równoważną metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 431) (3) oraz B.65 (równoważną metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 435) (4), dzięki którym, jeżeli jest to wymagane, można również zidentyfikować podkategorie żrących substancji chemicznych. Jako metodę badawczą B.46 (równoważną metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 439) (5) przyjęto szereg zweryfikowanych metod badawczych *in vitro* w celu wykorzystywania ich do badania podrażnienia skóry. W wytycznych OECD dotyczących zintegrowanych podejść do badań i oceny (IATA) działania żrącego na skórę i podrażnienia skóry opisano kilka modułów grupujących różne źródła informacji i narzędzia do analizy oraz (i) przedstawiono wytyczne dotyczące sposobu włączania i wykorzystywania istniejących danych, które uzyskano w ramach badań i metodami niebadawczymi, do celów oceny potencjałów substancji chemicznych pod względem działania drażniącego i żrącego na skórę, a także (ii) zaproponowano podejście w sytuacji gdy potrzebne są dalsze badania (6).

3. Niniejsza metoda badawcza odnosi się do punktu końcowego, jakim jest działanie żrące na skórę ludzką. Metoda ta opiera się na teście pomiaru przezskórnej oporności elektrycznej z użyciem skóry szczura, w którym wykorzystuje się krążki skóry, aby określić substancje żrące według ich zdolności do powodowania utraty normalnej integralności warstwy rogowej i funkcji ochronnej naskórka. Odpowiadającą wytyczną dotyczącą badań OECD przyjęto pierwotnie w 2004 r. i zaktualizowano w 2015 r., aby odnieść się do wytycznych IATA.

4. Aby ocenić badania działania żrącego na skórę *in vitro* do celów regulacyjnych, przeprowadzono badania poprzedzające walidację (7), po których przeprowadzono badanie walidacyjne testu pomiaru przezskórnej oporności elektrycznej z użyciem skóry szczura do pomiaru działania żrącego (8)(9)(10)(11). Wyniki tych badań doprowadziły do opracowania zalecenia, że metodę badawczą testu przezskórnej oporności

([1]) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

▼M8

elektrycznej (oznaczoną jako zwalidowana metoda referencyjna – VRM) można wykorzystywać do celów regulacyjnych oceny działania żrącego na skórę *in vivo* (12)(13)(14).

5. Zanim będzie można wykorzystać do celów regulacyjnych zaproponowaną podobną lub zmienioną metodę badawczą testu przezskórnej oporności elektrycznej *in vitro* inną niż VRM powinny zostać określone jej wiarygodność, istotność (dokładność) oraz ograniczenia dotyczące jej proponowanego wykorzystania, aby zapewnić jej podobieństwo do VRM zgodnie z wymogami standardów wykonywania badań (15). Wzajemne uznawanie danych OECD będzie zagwarantowane wyłącznie po poddaniu przeglądowi każdej nowej lub zaktualizowanej metody badawczej zgodnej ze standardem wykonywania badań i włączeniu jej do odpowiednich wytycznych OECD dotyczących badań.

DEFINICJE

6. Stosowane definicje znajdują się w dodatku.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

7. Na podstawie badania walidacyjnego (10) i innych opublikowanych badań (16) (17) stwierdzono, że dzięki metodzie badawczej testu przezskórnej oporności elektrycznej z użyciem skóry szczura możliwe jest rozróżnienie znanych substancji mających działanie żrące na skórę i substancji niemających takiego działania przy ogólnej wrażliwości na poziomie 94 % (51/54) i swoistości na poziomie 71 % (48/68) w przypadku bazy danych obejmującej 122 substancje.

8. Niniejsza metoda badawcza dotyczy działania żrącego na skórę *in vitro*. Umożliwia ona określenie badanych substancji chemicznych mających działanie żrące i niemających takiego działania zgodnie z GHS ONZ/rozporządzeniem CLP. Ograniczenie niniejszej metody badawczej, jak pokazano na podstawie badań walidacyjnych (8)(9)(10)(11), polega na tym, że metoda ta nie umożliwia podziału żrących substancji i mieszanin na podkategorie zgodnie z GHS ONZ/rozporządzeniem CLP. To, jak będzie stosowana niniejsza metoda badawcza zostanie określone w obowiązujących ramach regulacyjnych. Chociaż niniejsza metoda badawcza nie pozwala uzyskać odpowiednich informacji na temat podrażnienia skóry, należy zauważyć, że metoda badawcza B.46 dotyczy w szczególności badania *in vitro* (5) skutku dla zdrowia jakim jest podrażnienie skóry. Aby dokonać pełnej oceny miejscowego działania na skórę po pojedynczym narażeniu przez skórę, należy zapoznać się z wytycznymi OECD dotyczącymi IATA (6).

9. W ramach walidacji leżącej u podstaw niniejszej metody badawczej zbadano szeroką gamę produktów chemicznych, z których większość stanowiły substancje chemiczne, a w empirycznej bazie danych z badania walidacyjnego znalazło się 60 substancji obejmujących szeroki zakres klas chemicznych (8)(9). Z dostępnych ogólnych danych wynika, że metoda badawcza ma zastosowanie do wielu klas chemicznych i stanów skupienia, w tym do płynów, substancji półstałych, stałych i wosków. Jednak ponieważ dla konkretnych stanów skupienia elementy badane z odpowiednimi danymi porównawczymi nie są łatwo dostępne, należy zauważyć, że podczas zatwierdzania dokonano oceny stosunkowo niewielkiej liczby wosków i substancji stałych o działaniu żrącym. Ciecze mogą być wodne lub niewodne; substancje stałe mogą być rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie. W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania omawianej metody badawczej do konkretnej kategorii substancji, metody tej nie należy stosować w odniesieniu do tej konkretnej kategorii substancji. Ponadto przyjmuje się, że niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie nie tylko do substancji, ale także do mieszanin. Jednak ze względu na fakt, iż mieszaniny obejmują szeroki zakres kategorii oraz składów, oraz że obecnie dostępna jest niewielka ilość informacji na temat badania mieszanin, w przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania omawianej metody badawczej w odniesieniu do danej kategorii mieszanin (np. kierując się strategią zaproponowaną przez Eskesa i in., 2012) (18), metody tej nie należy stosować w odniesieniu do tej konkretnej kategorii mieszanin. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu

▼M8

widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny. Gazów i aerozoli nie oceniano jeszcze w badaniach walidacyjnych (8)(9). Chociaż nie można wykluczyć, że da się je badać z wykorzystaniem metody badawczej jaką jest test przezskórnej oporności elektrycznej, niniejsza metoda badawcza nie pozwala na badanie gazów i aerozoli.

ZASADA BADANIA

10. Badaną substancję chemiczną nakłada się na okres do 24 godzin na powierzchnię naskórka krążków skóry w dwuczęściowym układzie badawczym, w którym krążki skóry pełnią funkcję przegrody między dwoma częściami. Krążki skóry pobiera się od szczurów uśmiercanych w humanitarny sposób w wieku 28–30 dni. Substancje chemiczne mające działanie żrące identyfikuje się na podstawie ich zdolności do powodowania utraty integralności warstwy rogowej naskórka i do zaburzania funkcji ochronnej, co mierzy się spadkiem TER poniżej poziomu progowego (16) (zob. pkt 32). W przypadku testu przezskórnej oporności elektrycznej z użyciem skóry szczurów przyjęto wartość graniczną 5 kΩ; wartość tę ustalono na podstawie obszernych danych dla szerokiego zakresu substancji, w przypadku których znaczna większość wartości była albo wyraźnie wyższa (często > 10 kΩ) albo znacznie niższa (często < 3 kΩ) od tej wartości (16). Ogólnie badane substancje chemiczne, które w przypadku zwierząt nie mają działania żrącego, tylko drażniące lub nie mają działania drażniącego, nie powodują spadku przezskórnej oporności elektrycznej poniżej tej wartości granicznej. Co więcej, zastosowanie innych preparatów skóry lub innego sprzętu może zmienić wartość graniczną, powodując konieczność dalszej walidacji.

11. Etap wiązania barwnika jest włączony do procedury testowej mającej potwierdzić dodatnie wyniki testu przezskórnej oporności elektrycznej, w tym wartości około 5 kΩ. Etap wiązania barwnika pozwala na stwierdzenie, czy wzrost przepuszczalności jonów jest spowodowany fizycznym zniszczeniem warstwy rogowej naskórka. Wykazano, że metoda polegająca na teście przezskórnej oporności elektrycznej z wykorzystaniem skóry szczurów świadczy o działaniu żrącym *in vivo*, badanym u królików metodą badawczą B.4 (2).

WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

12. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania metody badawczej, jaką jest test przezskórnej oporności elektrycznej z użyciem skóry szczura, która to metoda jest zgodna z niniejszą metodą badawczą, laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo ustalając klasyfikację 12 substancji chemicznych zalecanych w tabeli 1. W sytuacji gdy substancja znajdująca się w wykazie jest niedostępna lub w uzasadnionych przypadkach można zastosować inną substancję, dla której dostępne są odpowiednie dane porównawcze z badań *in vivo* i *in vitro* (np. z wykazu referencyjnych substancji chemicznych (16)), pod warunkiem zastosowania tych samych kryteriów wyboru, które opisano w tabeli 1.

Tabela 1

Wykaz substancji służących do wykazania biegłości ([1])

Substancja	Numer CAS	Klasa chemiczna ([2])	Kategoria wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP na podstawie wyników badań *in vivo* ([3])	Kategoria VRM na podstawie wyników badań *in vitro*	Stan skupienia	pH ([4])
Substancje żrące *in vivo*						
N,N-Dimetylo-dipropylenotriamina	10563-29-8	zasada organiczna	1A	6 × Ż	L	8,3
1,2-Diaminopropan	78-90-0	zasada organiczna	1A	6 × Ż	L	8,3

▼**M8**

Substancja	Numer CAS	Klasa chemiczna ([2])	Kategoria wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP na podstawie wyników badań *in vivo* ([3])	Kategoria VRM na podstawie wyników badań *in vitro*	Stan skupienia	pH ([4])
Substancje żrące *in vivo*						
Kwas siarkowy (10 %)	7664-93-9	kwas nieorganiczny	(1A/)1B/1C	5 × Ż 1 × NŻ	L	1,2
Wodorotlenek potasu (10 % r.w.)	1310-58-3	zasada nieorganiczna	(1A/)1B/1C	6 × Ż	L	13,2
Kwas oktanowy (kaprylowy)	124-07-2	kwas organiczny	1B/1C	4 × Ż 2 × NŻ	L	3,6
Di-tert-butylofenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × Ż 2 × NŻ	L	3,9
Substancje niedziałające żrąco *in vivo*						
Kwas izostearynowy	2724-58-5	kwas organiczny	NŻ	6 × NŻ	L	3,6
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	zasada organiczna	NŻ	6 × NŻ	S	5,5
Bromek fenetylu	103-63-9	elektrofil	NC	6 × NŻ	L	3,6
4-(metyltio)-benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NŻ	6 × NŻ	L	6,8
1,9-dekadien	1647-16-1	obojętna organiczna	NŻ	6 × NŻ	L	3,9
tetrachloroetylen	127-18-4	obojętna organiczna	NŻ	6 × NŻ	L	4,5

Skróty: r.w. = roztwór wodny Numer CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service; VRM = zwalidowana metoda referencyjna; Ż = żrące; NŻ = nieżrące.

([1]) Substancje służące do wykazania biegłości, podzielone w pierwszej kolejności na substancje działające i niedziałające żrąco, następnie według podkategorii działania żrącego i klasy chemicznej, wybrano spośród substancji wykorzystanych w badaniu walidacyjnym ECVAM metody badawczej jaką jest test przezskórnej oporności elektrycznej z użyciem skóry szczura (8)(9). O ile nie wskazano inaczej, substancje przebadano na wysokim poziomie czystości uzyskanym po nabyciu ich z handlowego źródła (8). Wybór obejmuje w możliwym zakresie substancje, które: (i) są reprezentatywne dla zakresu reakcji żrących (np. substancje niedziałające żrąco; od słabo do silnie żrących substancji), które za pomocą metody VRM można zmierzyć lub przewidzieć (ii) są reprezentatywne dla klas chemicznych wykorzystywanych w badaniu walidacyjnym; (iii) odzwierciedlają cechy związane z efektywnością metody VRM; (iv) mają dobrze określoną strukturę chemiczną; (v) dają ostateczne wyniki w referencyjnej metodzie badawczej *in vivo*; (vi) są dostępne na rynku; oraz (vii) nie są związane z wygórowanymi kosztami utylizacji.

([2]) Klasa chemiczna przypisana przez Barratta et al. (8).

([3]) Odpowiadające grupy opakowaniowe ONZ to I, II oraz III odpowiednio dla kategorii 1A, 1B oraz 1C Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów/rozporządzenia CLP.

([4]) Źródłem wartości pH jest Fentem *et al.* (9) oraz Barratt *et al.* (8).

▼M8

PROCEDURA

13. Dostępne są standardowe procedury operacyjne z wykorzystaniem skóry szczura w odniesieniu do metody badawczej jaką jest test przezskórnej oporności elektrycznej na działanie żrące na skórę (19). Metody badawcze polegające na teście przezskórnej oporności elektrycznej z wykorzystaniem skóry szczura powinny spełniać następujące warunki:

Zwierzęta

14. Należy wykorzystać szczury, ponieważ wcześniej wykazano wrażliwość ich skóry na substancje stosowane w niniejszej metodzie badawczej (12) oraz jest to jedyny formalnie zatwierdzony rodzaj skóry (8)(9). Wiek (w momencie pobierania skóry) i szczep szczurów mają zasadnicze znaczenie, bowiem od tego zależy, czy mieszki włosowe są w stanie uśpienia poprzedzającym fazę wzrostu włosa u dorosłych osobników.

15. Owłosienie z grzbietu i boku ciała młodych, około 22-dniowych samców lub samic szczurów (pochodzących od szczepu Wistar lub podobnych) zostaje starannie usunięte małą maszynką do strzyżenia. Następnie zwierzęta są dokładnie przemywane i wycierane, natomiast miejsca, z których usuwano owłosienie, są pokrywane roztworem antybiotyku (zawierającym na przykład streptomycynę, penicylinę, chloramfenikol i amfoterycynę w stężeniach zapewniających zahamowanie rozwoju bakterii). Zwierzęta są przemywane antybiotykiem powtórnie trzeciego lub czwartego dnia po pierwszym przemyciu i są poddawane eksperymentowi w ciągu 3 dni od drugiego przemycia, kiedy warstwa rogowa naskórka ulegnie regeneracji po usunięciu owłosienia.

Przygotowanie krążków skóry

16. Zwierzęta są humanitarnie uśmiercane, gdy osiągną 28–30 dzień życia; ten wiek ma kluczowe znaczenie. Z grzbietu i boków ciała każdego zwierzęcia pobierana jest skóra, z której następnie starannie usuwa się nadmiar tłuszczu podskórnego. Pobierane są krążki skóry, każdy o średnicy około 20 mm. Przed użyciem krążków skóra może być przechowywana, jeśli wykazano, że dane dla kontroli dodatniej i ujemnej są równoważne z danymi uzyskanymi przy użyciu świeżej skóry.

17. Każdy krążek skóry jest umieszczany nad jednym z końców rurki PTFE (politetrafluoroetylenowej), przy czym należy dopilnować, aby powierzchnia naskórka przylegała do rurki. Na koniec rurki wciskany jest gumowy pierścień, który utrzymuje skórę w odpowiednim położeniu, a nadmiar tkanki jest odcinany. Połączenie między rurką PTFE a gumowym pierścieniem jest następnie starannie uszczelniane wazeliną. Rurka jest następnie mocowana zaciskiem sprężynowym wewnątrz komory receptorowej zawierającej roztwór $MgSO_4$ (154 mM) (rysunek 1). Krążek skóry powinien być całkowicie zanurzony w roztworze $MgSO_4$. Ze skóry jednego szczura można otrzymać aż 10–15 krążków. Wymiary rurki i pierścienia pokazano na rysunku 2.

18. Przed rozpoczęciem badania, w ramach procedury kontroli jakości, przezskórną oporność elektryczną na dwóch krążkach skóry mierzy się w odniesieniu do skóry każdego ze zwierząt. Aby reszta krążków mogła zostać wykorzystana w metodzie badawczej, wartości oporu elektrycznego dla obu krążków powinny być wyższe niż 10 kΩ. Jeśli wartość oporu jest mniejsza niż 10 kΩ, resztę krążków tej skóry należy wyrzucić.

Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej

19. Aby zapewnić odpowiednie działanie modelu, w każdej analizie (doświadczeniu) należy równocześnie stosować kontrole dodatnie i ujemne. W każdej analizie (doświadczeniu) należy wykorzystać krążki skóry pozyskane z pojedynczego zwierzęcia. Jako badanych substancji chemicznych kontroli dodatniej i ujemnej zaleca się używać odpowiednio 10M kwasu solnego i wody destylowanej.

▼M8

20. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym nanosi się równomiernie na powierzchnię naskórka wewnątrz rurki (150 µl). Aby podczas badania materiałów stałych mieć pewność, że pokryta jest cała powierzchnia, na krążek nakłada się równomiernie odpowiednią ilość materiału stałego. Do substancji stałej dodaje się wodę dejonizowaną (150 µl) i delikatnie potrząsa się rurką. W celu zapewnienia maksymalnego kontaktu substancji stałych ze skórą może być konieczne podgrzanie ich do 300 °C w celu stopienia lub zmiękczenia badanej substancji chemicznej, lub jej zmielenie, by otrzymać granulat lub proszek.

21. W każdej serii badawczej (każdym doświadczeniu) wykorzystuje się trzy krążki skóry w odniesieniu do każdej serii badawczej i kontrolnej substancji chemicznej. Badane substancje chemiczne nakłada się na 24 godziny w temperaturze 20–23 °C. Usuwa się je, zmywając strumieniem wody wodociągowej o temperaturze pokojowej do momentu, gdy nie będzie można usunąć żadnego dalszego materiału.

Pomiary przezskórnej oporności elektrycznej

22. Impedancję skóry mierzy się jako przezskórną oporność elektryczną za pomocą mostka Wheatstone'a zasilanego prądem przemiennym o niskim napięciu (18). Ogólne dane techniczne mostka: napięcie robocze 1–3 V, prąd przemienny 50–1 000 Hz sinusoidalny lub prostokątny i zakres pomiaru co najmniej 0,1–30 kΩ. Mostek Wheatstone'a w badaniach walidacyjnych mierzy indukcyjność, opór bierny pojemnościowy i opór do wartości odpowiednio 2 000 H, 2 000 µF oraz 2 MΩ, przy częstotliwości odpowiednio 100 Hz lub 1 kHz w połączeniach szeregowych lub równoległych. Do celów oceny testu działania żrącego TER dokonuje się pomiarów oporności przy częstotliwości 100 Hz i przy zastosowaniu połączeń szeregowych. Przed pomiarem oporu elektrycznego zmniejsza się napięcie skóry, dodając dostateczną ilość 70 % etanolu, aby pokryła naskórek. Po kilku sekundach usuwa się etanol z rurki, a następnie nawadnia się tkankę przez dodanie 3 ml roztworu $MgSO_4$ (154 mM). W celu zmierzenia oporu krążka skóry w kΩ, po obu jego stronach są umieszczane elektrody mostka (rysunek 1). Na rysunku 2 pokazano wymiary elektrod i długość obnażonej części elektrod poniżej zacisku szczękowego. W czasie pomiaru oporu zacisk przymocowany do wewnętrznej elektrody opiera się na górnym końcu rurki PTFE, aby w roztworze $MgSO_4$ zanurzony był ciągły odcinek elektrody. Elektroda zewnętrzna umieszczona jest wewnątrz komory receptorowej na jej dnie. Należy utrzymywać stałą odległość między zaciskiem sprężynowym a dnem rurki PTFE (rysunek 2), ponieważ odległość ma wpływ na otrzymywane wartości oporu. W związku z tym odległość między wewnętrzną elektrodą a krążkiem skóry powinna być stała i minimalna (1–2 mm).

23. Jeśli zmierzona wartość oporu jest większa niż 20 kΩ, może to być spowodowane pozostałościami badanej substancji chemicznej pokrywającej naskórkową powierzchnię krążka skóry. Można próbować usunąć tę warstwę, zatykając na przykład rurkę palcem w rękawiczce i potrząsając nią przez około 10 sekund; usuwa się roztwór $MgSO_4$ i powtarza pomiar oporu ze świeżą porcją $MgSO_4$.

24. Na otrzymane wartości testu przezskórnej oporności elektrycznej mogą mieć wpływ charakterystyka i wymiary aparatu testowego oraz zastosowana procedura eksperymentalna. Na podstawie danych uzyskanych przy użyciu określonej aparatury i procedury, przedstawionych w opisie tej metody badawczej, ustalono próg działania żrącego na skórę na poziomie 5 kΩ. Jeśli warunki testu zostaną zmienione lub jeśli stosuje się inną aparaturę, zastosowanie mogą znajdować inne progi i wartości kontrolne. Tak więc konieczne jest dokonanie kalibracji metodyki i wartości progów oporu przez zbadanie szeregu substancji służących do wykazania biegłości wybranych spośród substancji chemicznych użytych w badaniu walidacyjnym (8)(9) lub spośród substancji chemicznych podobnych do badanych substancji. W tabeli 1 znajduje się zestaw odpowiednich substancji służących do wykazania biegłości.

▼M8

Metody wiązania barwników

25. Narażenie na niektóre materiały niedziałające żrąco na skórę może prowadzić do zmniejszenia oporu poniżej wartości granicznej 5 kΩ, umożliwiając przechodzenie jonów przez warstwę rogową naskórka i w ten sposób redukując opór elektryczny (9). Na przykład obojętne związki organiczne oraz substancje powierzchniowo czynne (w tym detergenty, emulgatory i inne surfaktanty) mogą usuwać ze skóry tłuszcz, powodując, że bariera skórna staje się bardziej przepuszczalna dla jonów. Tak więc, jeśli wartości TER wytworzone przez takie substancje chemiczne są niższe niż lub zbliżone do 5 kΩ przy braku wizualnie dostrzegalnego uszkodzenia krążków skóry, należy dla tkanek kontrolnych i badanych przeprowadzić test przenikania barwnika, aby stwierdzić, czy uzyskane wartości TER są wynikiem zwiększonej przepuszczalności skóry czy jej uszkodzenia (7)(9). W tym drugim przypadku, jeśli uszkodzona jest warstwa rogowa naskórka, barwnik sulforodamina B szybko przenika w głąb skóry i zabarwia leżącą głębiej tkankę. Ten szczególny barwnik nie wchodzi w reakcję z wieloma różnymi substancjami chemicznymi i nie ma na niego wpływu procedura ekstrakcji opisana poniżej.

Stosowanie barwnika sulforodaminy B i jego usuwanie

26. Po dokonaniu oceny testu przezskórnej oporności elektrycznej siarczan magnezu jest usuwany z rurki i skóra jest poddawana dokładnym oględzinom, aby sprawdzić, czy są na niej widoczne uszkodzenia. Jeżeli nie ma oczywistych dużych uszkodzeń (np. perforacji), na naskórkową powierzchnię każdego krążka skóry nakłada się na dwie godziny 150 µl 10 proc. (masa/obj.) roztworu barwnika sulforodaminy B w wodzie destylowanej (Acid Red 52; C.I. 45100; nr CAS 3520-42-1). Krążki skóry są następnie przemywane wodą wodociągową o temperaturze nie wyższej od pokojowej przez około 10 sekund, aby usunąć wszelki zbędny/niezwiązany barwnik. Każdy krążek skóry jest starannie usuwany z rurki PTFE i umieszczany w fiolce (np. w szklanej fiolce scyntylacyjnej o pojemności 20 ml) zawierającej wodę dejonizowaną (8 ml). Fiolki są delikatnie wstrząsane przez 5 minut, aby usunąć cały nadmiar niezwiązanego barwnika. Procedurę płukania powtarza się, po czym krążki skóry wyjmuje się i umieszcza w fiolkach zawierających 5 ml 30 % (masa/obj.) roztworu sodowego siarczanu dodecylu (SDS) w wodzie destylowanej i inkubuje przez noc w 60 °C.

27. Po inkubacji krążki należy wyjąć i wyrzucić, a pozostały roztwór odwirować przez 8 minut w 21 °C (względna siła odśrodkowa ~175 × g). Próbka o objętości 1 ml supernatantu jest rozpuszczana w stosunku 1 do 5 (obj./obj.) [tj. 1 ml + 4 ml] z 30 % (masa/obj) SDS w wodzie destylowanej. Gęstość optyczną (OD) mierzy się przy 565 nm.

Obliczanie zawartości barwnika

28. Zawartość barwnika sulforodaminy B na krążek obliczana jest na podstawie wartości OD (9) (współczynnik molowy ekstynkcji sulforodaminy B przy 565 nm = 8,7 × $l0^4$; masa cząsteczkowa = 580). Zawartość barwnika jest określana dla wszystkich krążków skóry przy zastosowaniu odpowiedniej krzywej kalibracyjnej, a następnie dla wszystkich kontrprób liczona jest średnia.

Kryteria dopuszczalności

29. Średnie wyniki TER są uznawane, jeśli w testującym laboratorium wartości otrzymane w równoczesnych próbach kontroli dodatniej i ujemnej mieszczą się w zakresie dopuszczalnym dla metody. Dopuszczalne zakresy oporu dla metodyki i aparatury opisanych powyżej podano w poniższej tabeli:

▼**M8**

Kontrola	Substancja	Zakres oporu (kΩ)
Dodatnia	Kwas chlorowodorowy 10 M	0,5 – 1,0
Ujemna	Woda destylowana	10 – 25

30. Średnie wyniki wiązania barwnika są akceptowane, pod warunkiem że wartości otrzymane w równoczesnych testach kontrolnych mieszczą się w przedziałach akceptowanych dla metody. Sugerowane dopuszczalne zakresy zawartości barwnika substancji kontrolnych dla metodyki i aparatury opisanych powyżej zamieszczono w poniższej tabeli:

Kontrola	Substancja	Zakres zawartości barwnika (μg/krążek)
Dodatnia	Kwas chlorowodorowy 10 M	40 – 100
Ujemna	Woda destylowana	15 – 35

Interpretacja wyników

31. Wartość graniczną testu przezskórnej oporności elektrycznej, odróżniającą żrące substancje chemiczne od substancji chemicznych niemających działania żrącego, ustanowiono podczas optymalizacji metody badawczej, testowano w fazie prewalidacyjnej oraz zatwierdzono w formalnym badaniu walidacyjnym.

32. Poniżej przedstawiono związany z systemem klasyfikacji Globalnego Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów / rozporządzenia CLP model prognozowania z wykorzystaniem skóry szczura w odniesieniu do metody badawczej, jaką jest test przezskórnej oporności elektrycznej na działanie żrące na skórę (9)(19):

Uznaje się, że badana substancja chemiczna nie działa żrąco na skórę:

i) jeśli średnia wartość uzyskana w teście przezskórnej oporności elektrycznej dla badanej substancji chemicznej jest większa (>) niż 5 kΩ; lub

ii) jeśli średnia wartość uzyskana w teście przezskórnej oporności elektrycznej dla badanej substancji chemicznej jest mniejsza bądź równa (≤) 5 kΩ; oraz

— krążki skóry nie wykazują oczywistych uszkodzeń (np. perforacji); oraz

— średnia zawartość barwnika krążka jest niższa (<) niż średnia zawartość barwnika krążka otrzymanej jednocześnie kontroli dodatniej 10M HCl (zob. pkt 30 w odniesieniu do wartości kontroli dodatnich).

Uznaje się, że badana substancja chemiczna działa żrąco na skórę:

i) jeśli średnia wartość uzyskana w teście przezskórnej oporności elektrycznej dla badanej substancji chemicznej jest mniejsza bądź równa (≤) 5 kΩ oraz krążki skóry posiadają oczywiste uszkodzenia (np. są perforowane); lub

ii) jeśli średnia wartość uzyskana w teście przezskórnej oporności elektrycznej dla badanej substancji chemicznej jest mniejsza bądź równa (≤) 5 kΩ; oraz

— krążki skóry nie wykazują oczywistych uszkodzeń (np. perforacji); ale

▼M8

— średnia zawartość barwnika krążka jest większa bądź równa (≥) średniej zawartości barwnika krążka otrzymanej jednocześnie kontroli dodatniej 10M HCl (zob. pkt 30 w odniesieniu do wartości kontroli dodatnich).

33. Jeśli klasyfikacja jest jednoznaczna, seria badawcza (doświadczenie), w skład której wchodzą co najmniej trzy kontrpróby, powinna wystarczyć dla badanej substancji chemicznej. W przypadku wyników granicznych, np. niezgodności powtarzalnych pomiarów lub średniej TER równej 5 ± 0,5 kΩ, należy jednak rozważyć przeprowadzenie drugiej niezależnej serii badawczej (doświadczenia), jak również trzeciej w przypadku niezgodności między wynikami dwóch pierwszych serii badawczych (doświadczeń).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

34. Wartości oporu (kΩ) oraz, w stosownych przypadkach, wartości zawartości barwnika (μg/krążek) w odniesieniu do badanej substancji chemicznej oraz kontroli dodatnich i ujemnych należy zgłaszać w postaci tabeli, która będzie zawierać dane dotyczące każdego krążka kontrpróby w każdej serii badawczej (każdym doświadczeniu) oraz średnie wartości ± SD. Należy zgłaszać wszystkie powtarzane doświadczenia. Zaobserwowane uszkodzenia krążków skóry należy zgłaszać w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Sprawozdanie z badania

35. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna oraz substancje kontrolne:

— Substancja jednoskładnikowa: dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina: opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników;

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— źródło, numer partii (jeżeli dostępny);

— w stosownych przypadkach obróbka badanej substancji chemicznej/substancji kontrolnej przed badaniem (np. ogrzanie, rozdrobnienie);

— stabilność badanej substancji chemicznej, termin przydatności lub data ponownej analizy, jeżeli są znane;

— warunki przechowywania.

Zwierzęta doświadczalne:

— szczep i płeć;

— wiek zwierząt w momencie pobierania skóry;

— źródło, warunki utrzymywania, pasza itp.;

— szczegóły dotyczące przygotowania skóry.

▼**M8**

Warunki badania:

— krzywe wzorcowe dla aparatury testowej;

— krzywe wzorcowe dla parametrów testu wiązania barwnika, wykorzystanego filtru środkowoprzepustowego stosowanego do pomiaru wartości OD oraz, w stosownych przypadkach, zakres liniowości OD urządzenia wykorzystywanego do przeprowadzania pomiaru (np spektrofotometr);

— szczegółowe informacje na temat procedury badawczej stosowanej do pomiarów przezskórnej oporności elektrycznej;

— szczegółowe informacje na temat procedury badawczej stosowanej do oceny wiązania barwnika, w stosownych przypadkach;

— zastosowane dawki badanej substancji chemicznej, czas trwania okresu lub okresów narażenia oraz temperatura lub temperatury narażenia;

— szczegółowe informacje na temat stosowanej procedury mycia po okresie narażenia;

— Liczba wykorzystywanych kontrprób krążków skóry na każdą badaną substancję chemiczną oraz kontrolę (kontrola dodatnia i ujemna);

— opis wszelkich modyfikacji procedur testowych;

— odniesienie do danych historycznych modelu. Powinno to między innymi obejmować:

  i) dopuszczalność wartości przezskórnej oporności elektrycznej kontroli dodatniej oraz ujemnej (w k Ω) w odniesieniu do zakresów oporu kontroli dodatniej oraz ujemnej;

  ii) dopuszczalność wartości zawartości barwnika kontroli dodatniej oraz ujemnej (w µg/krążek) w odniesieniu do zakresów oporu kontroli dodatniej oraz ujemnej;

  iii) dopuszczalność wyników badania w odniesieniu do historycznej zmienności między kontrpróbami krążków skóry.

— Opis zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji/modelu prognozowania.

Wyniki:

— Tabele zawierające dane z badań TER i testu wiązania barwnika (w stosownych przypadkach) dla poszczególnych badanych substancji chemicznych oraz kontroli, dla każdej serii badawczej (każdego doświadczenia) oraz każdej kontrpróby krążka skóry (poszczególne zwierzęta i poszczególne próbki skóry), średnie, wartości SD oraz CV;

— opis wszelkich zaobserwowanych skutków;

— ustalona na tej podstawie klasyfikacja w odniesieniu do modelu prognozowania lub zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji.

Omówienie wyników

Wnioski

BIBLIOGRAFIA

(1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie drugie zmienione, ONZ Nowy Jork i Genewa 2013. Dostępne na stronie internetowej: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html]

▼**M8**

(2) Rozdział B.4 niniejszego załącznika, *Ostre działanie drażniące na skórę.*

(3) Rozdział B.40bis niniejszego załącznika, *Model skóry in vitro.*

(4) Rozdział B.65 niniejszego załącznika, *Metoda badawcza bariery membranowej in vitro.*

(5) Rozdział B.46 niniejszego załącznika, *Badanie podrażnień skóry* in vitro*: Metoda badania z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka.*

(6) OECD (2014). *Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion,* [w:] *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 203), Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(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., i Balls M. (1995). *A Prevalidation Study on In Vitro Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.* „ALTA" nr 23, s. 219–255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., i Worth A.P. (1998). *The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity.* 1. *Selection and distribution of the test chemicals.* „Toxicology *In Vitro*" nr 12, s. 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. i 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*" nr 12, s. 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., i Zucco F. (1995). *Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.* „ALTA" nr 23, s. 129–147.

(11) ICCVAM (Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych) (1997). *Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods.* Publikacja NIH nr 97-3981, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, Karolina Północna, Stany Zjednoczone.

(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).* ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 kwietnia 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA nr 26, 275–280.

(14) ICCVAM (Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych) (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" nr 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, Karolina Północna, USA.

(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.* [w:] *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 218), Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

▼**M8**

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A. i Rhodes C. (1986). *An In Vitro Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation.* „Food and Chemical Toxicology" nr 24, s. 507–512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., i Gardner J. (1992). *The Skin Corrosivity Test In Vitro: Results of an Interlaboratory Trial.* „Toxicology in Vitro" nr 6, s. 191–194.

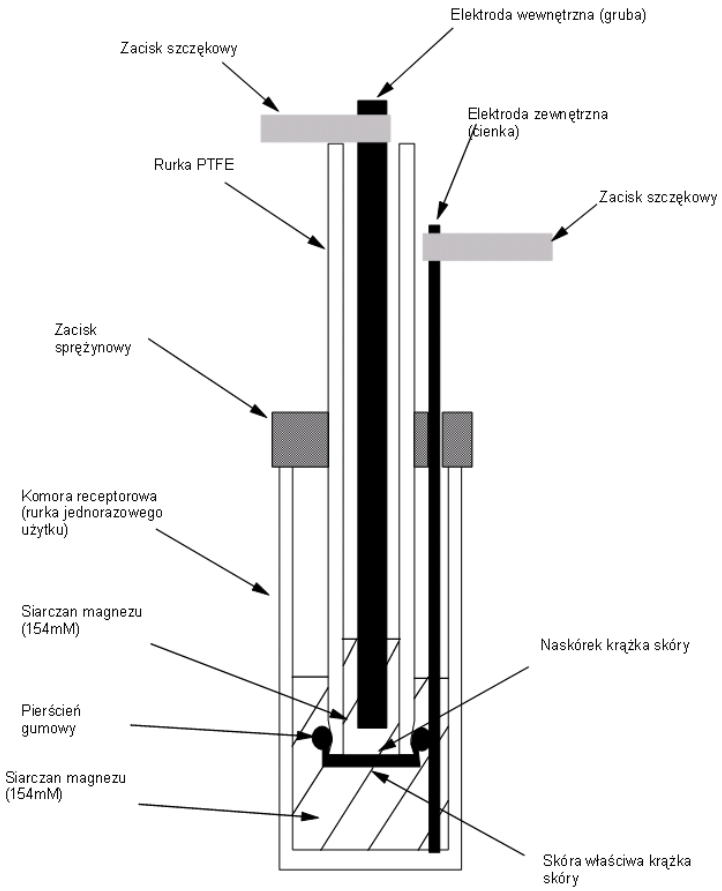
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher 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. i Depallens O. (2012). *Regulatory Assessment of In Vitro Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations.* „Regulatory Toxicology and Pharmacology" nr 62, s. 393–403.

(19) TER SOP (grudzień 2008), Protokół 115 INVITTOX, *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.* [w:] *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 34), Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

Rysunek 1

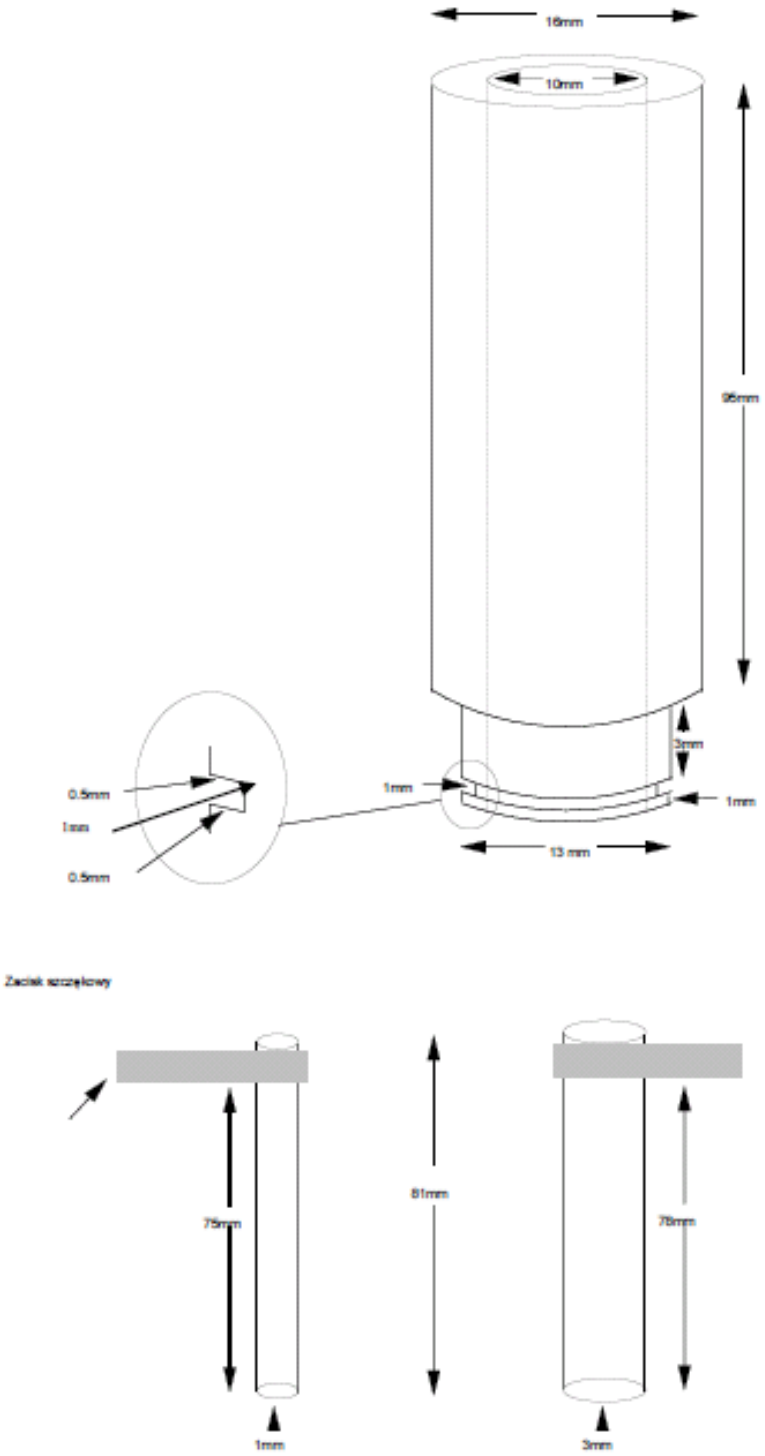
Aparatura do wykonywania testu przezskórnej oporności elektrycznej skóry szczura



▼**M8**

Rysunek 2

Wymiary Rurek Politetrafluoroetylenowej (Pfte) I Receptorowej Oraz Stosowane Elektrody



Najważniejsze elementy urządzenia przedstawionego powyżej:

— wewnętrzna średnica rurki PTFE,

— długość elektrod w stosunku do rurek PTFE i receptorowej dobrana tak, aby elektrody nie dotykały do krążka skóry oraz by standardowy odcinek elektrody stykał się z roztworem $MgSO_4$,

▼**M8**

— ilość roztworu $MgSO_4$ w rurce receptorowej powinna zapewniać wysokość słupa cieczy względem poziomu w rurce PTFE, jak pokazano na rysunku 1,

— krążek skóry powinien być wystarczająco mocno przymocowany do rurki PFTE, aby opór elektryczny był rzeczywistą miarą właściwości skóry.

▼M8

Dodatek

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności wyników zastosowanej metody badawczej z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na określenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (20).

C: żrący.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Zgodność: miara efektywności metody badawczej w odniesieniu do metod badawczych, które dają wyniki kategoryczne; jest jednym z aspektów istotności. To określenie jest czasami stosowane wymiennie z określeniem „dokładność"; definiuje się jako odsetek wszystkich badanych substancji chemicznych, które są prawidłowo sklasyfikowane jako dodatnie lub ujemne. Zgodność jest w dużym stopniu uzależniona od przewagi dodatnich wyników w rodzajach badanej substancji chemicznej (20).

GHS (Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (ONZ)): system obejmujący klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki, mające informować na temat szkodliwego działania tych substancji chemicznych w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) oraz środowiska (1).

IATA: zintegrowane podejście do badań i oceny.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór składający się z co najmniej dwóch substancji.

Substancja jednoskładnikowa: substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

Substancja wieloskładnikowa: substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu ≥ 10 % (w/w) i < 80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się w wyniku zmieszania co najmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

NŻ: substancja niemająca działania żrącego.

OD: gęstość optyczna.

PC: Kontrola dodatnia; kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża.

▼**M8**

Standardy wykonywania badań: normy oparte na zwalidowanej metodzie badania, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badawczej, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: (i) zasadnicze elementy metody badawczej; (ii) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania dopuszczalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz (iii) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badawczej, który proponowana metoda badawcza powinna osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono istotne i użyteczne dla konkretnego celu. Jest to zakres, w jakim metoda badawcza prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badawczej (20).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną (20).

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (20).

Działanie żrące na skórę*in vivo*: powstanie nieodwracalnego uszkodzenia skóry; tj. widocznej martwicy przebiegającej przez naskórek w głąb skóry, spowodowanej naniesieniem badanej substancji chemicznej na okres nieprzekraczający czterech godzin. Reakcjami na działanie żrące są wrzody, krwotoki, krwawiące strupy oraz – po zakończeniu 14-dniowej obserwacji – odbarwienia wynikłe ze zblednięcia skóry, obszary jednolitej alopecji, a także blizny. Celem oceny wątpliwych uszkodzeń można przeprowadzić badanie histopatologiczne.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (20).

Substancja: pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

Seria (badawcza): Pojedyncza substancja chemiczna badana jednocześnie na co najmniej trzech kontrpróbach krążków skóry.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Test przezskórnej oporności elektrycznej (TER): miara elektrycznej impedancji skóry jako wartość oporu w kiloomach. Jest to prosta i pewna metoda oceny funkcji ochronnej skóry polegająca na rejestrowaniu przechodzenia przez skórę jonów za pomocą mostka Wheatstone'a.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

▼M8

B.40*bis*. **BADANIE DZIAŁANIA ŻRĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO*: METODA BADAWCZA Z UŻYCIEM ZREKONSTRUOWANEGO LUDZKIEGO NASKÓRKA**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 431 (2016). Działanie żrące na skórę oznacza powstawanie nieodwracalnych uszkodzeń skóry, które przejawiają się jako widoczna martwica naskórka i skóry, w wyniku naniesienia na skórę substancji badanej [zgodnie z definicją Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ) (1) i z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP) ([1])]. Niniejsza zaktualizowana metoda badawcza B.40bis obejmuje procedurę *in vitro* umożliwiającą identyfikację substancji i mieszanin mających działanie żrące i niemających takiego działania zgodnie z GHS ONZ oraz rozporządzeniem CLP. Umożliwia ona również częściowy podział substancji działających żrąco na podkategorie.

2. Ocena potencjalnego działania żrącego na skórę substancji chemicznych wiązała się zwykle z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych (metoda badawcza B.4 równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 404, pierwotnie przyjętej w 1981 r. i zmienionej w latach 1992, 2002 i 2015) (2). Poza niniejszą metodą badawczą B.40bis zweryfikowano i przyjęto dwie inne metody badawcze *in vitro* służące badaniu potencjalnego działania żrącego substancji chemicznych jako metodę badawczą B.40 (równoważną metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 430) (3) oraz B.65 (równoważną metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 435) (4). Ponadto w celu badania potencjalnego działania drażniącego na skórę przyjęto metodę badawczą B.46 *in vitro* (równoważną metodzie opisanej w wytycznej dotyczącej badań OECD (TG) 439) (5). W wytycznych OECD dotyczących zintegrowanych podejść do badań i oceny (IATA) działania żrącego na skórę i podrażnienia skóry opisano kilka modułów grupujących źródła informacji i narzędzia do analizy oraz (i) przedstawiono wytyczne dotyczące sposobu włączania i wykorzystywania istniejących danych, które uzyskano w ramach badań i metodami niebadawczymi, do celów oceny potencjałów substancji chemicznych pod względem działania drażniącego i żrącego na skórę, a także (ii) zaproponowano podejście w sytuacji gdy potrzebne są dalsze badania (6).

3. Niniejsza metoda badawcza odnosi się do punktu końcowego, jakim jest działanie żrące na skórę ludzką. Wykorzystuje się w niej zrekonstruowany ludzki naskórek (RhE) (otrzymany z niezmienionych keratynocytów naskórka pochodzenia ludzkiego), który dokładnie imituje historyczne, morfologiczne, biochemiczne i fizjologiczne właściwości górnych warstw ludzkiej skóry, tj. naskórka. Odpowiadającą wytyczną dotyczącą badań OECD przyjęto pierwotnie w 2004 r. i zaktualizowano w 2013 r., aby zawrzeć w niej dodatkowe metody badawcze z wykorzystaniem modeli zrekonstruowanego ludzkiego naskórka oraz możliwość wykorzystania tych metod w celu uzasadnienia podziału substancji chemicznych mających działanie żrące na kategorie; w 2015 r. zaktualizowano wytyczną, by odnieść się do wytycznych IATA oraz wprowadzić wykorzystanie alternatywnej procedury pomiaru żywotności.

4. W niniejszej metodzie badawczej zawarto cztery zatwierdzone i dostępne na rynku modele RhE. W odniesieniu do dwóch z tych dostępnych na rynku modeli – model standardowy EpiSkin™ (SM) oraz badanie działania żrącego na skórę EpiDerm™ (SCT) (EPI-200) (nazywane w dalszej części tekstu zwalidowanymi metodami referencyjnymi – VRM) – przeprowadzono (11)(12) badania prewalidacyjne (7) po których nastąpiło badanie walidacyjne w celu oceny działania żrącego na skórę (8)(9)(10). W wyniku tych badań opracowano zalecenie, że dwie wspomniane VRM można stosować do celów regulacyjnych, by odróżnić żrące substancje (Ż) od substancji niemających

([1]) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

▼M8

działania żrącego (NŻ), oraz że model EpiSkin™ można ponadto stosować, by uzasadnić podział substancji żrących na podkategorie (13)(14)(15). W wyniku zastosowania dwóch pozostałych dostępnych na rynku modeli badania działania żrącego na skórę *in vitro* z wykorzystaniem RhE uzyskano podobne wyniki do VRM EpiDerm™ zgodnie z walidacją opartą na standardach wykonywania badań (16)(17)(18). Są to metody SkinEthic™ RHE ([1]) oraz epiCS® (wcześniej znane pod nazwą EST-1000), które również można stosować do celów regulacyjnych, by odróżnić substancje żrące od tych, które nie mają działania żrącego (19)(20). Dzięki badaniom powalidacyjnym wykonanym przez producentów modelu RhE w latach 2012–2014 z udoskonalonym protokołem korygującym interferencje nieswoistej redukcji MTT przez badaną substancję chemiczną poprawiono efektywność zarówno jeżeli chodzi o rozróżnianie, czy substancja jest żrąca, czy nie, jak i jeżeli chodzi o uzasadnienie podziału substancji żrących na podkategorie (21)(22). Dalsze analizy statystyczne powalidacyjnych danych wygenerowanych dzięki EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i EpiCS® wykonano w celu określenia alternatywnych modeli predykcyjnych, dzięki którym poprawiono zdolność predykcyjną podziału na podkategorie (23).

5. Zanim będzie można wykorzystać do celów regulacyjnych zaproponowaną podobną lub zmienioną metodę badawczą *in vitro* działania żrącego na skórę z wykorzystaniem RhE inną niż VRM należy określić jej wiarygodność, istotność (dokładność) oraz ograniczenia dotyczące jej proponowanego wykorzystania, aby zapewnić jej podobieństwo do VRM zgodnie z wymogami standardów wykonywania badań (24) określonymi zgodnie z zasadami przedstawionymi w wytycznej dotyczącej badań OECD nr 34 (25). Wzajemne uznawanie danych będzie zagwarantowane dopiero po dokonaniu przeglądu i włączeniu do odpowiadającej wytycznej dotyczącej badań jakiejkolwiek zaproponowanej nowej lub zaktualizowanej metody badawczej zgodnej ze standardem wykonywania badań. Modele badań objęte wytyczną dotyczącą badań można wykorzystywać, by spełnić wymagania państw dotyczące wyników badań metody badawczej działania żrącego na skórę *in vitro*, korzystając jednocześnie z wzajemnego uznawania danych.

DEFINICJE

6. Zastosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

7. Niniejsza metoda badawcza umożliwia identyfikację substancji i mieszanin mających działanie żrące i niemających takiego działania zgodnie z GHS ONZ oraz rozporządzeniem CLP. Niniejsza metoda badawcza umożliwia podział na podkategorie substancji i mieszanin mających działanie żrące; kategorie te to fakultatywna podkategoria 1A zgodnie z GHS ONZ (1) oraz połączenie podkategorii 1B i 1C (21)(22)(23). Ograniczenie niniejszej metody badawczej polega na tym, że nie pozwala ona na rozróżnienie między podkategorią 1B (działanie żrące na skórę) a podkategorią 1C zgodnie z GHS ONZ i rozporządzeniem CLP ze względu na ograniczony zestaw dobrze znanych substancji chemicznych mających działanie żrące na skórę *in vivo* należących do podkategorii 1C. Podział na podkategorie jest możliwy dzięki modelom badań EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i epiCS® (tj. 1A a 1B oraz 1C a substancje niemające działania żrącego na skórę).

8. W ramach walidacji wspierającej modele badań objęte niniejszą metodą badawczą przebadano szeroki zakres substancji chemicznych reprezentujących głównie poszczególne substancje, kiedy są one wykorzystywane do określania, które substancje mają działanie żrące, a które nie; w empirycznej bazie danych z badania walidacyjnego znalazło się 60 substancji chemicznych obejmujących szeroki zakres klas chemicznych (8)(9)(10). Badanie mające na celu wykazanie wrażliwości

([1]) Skrót RhE (ang. *Reconstructed human Epidermis*, zrekonstruowany ludzki naskórek) stosuje się w przypadku wszystkich modeli opartych na technologii RhE. Skrót RhE stosowany w połączeniu z modelem SkinEthic™ oznacza to samo, jednak gdy jest on częścią nazwy konkretnej metody badawczej na rynku, cały skrót pisze się drukowanymi literami.

▼M8

testu podziału na podkategorie, jego swoistości, dokładności i odtwarzalności w warunkach laboratoryjnych wykonali twórcy metody badawczej, a przegląd wyników wykonała OECD (21)(22)(23). Z dostępnych ogólnych danych wynika, że metoda badawcza ma zastosowanie do wielu klas chemicznych i stanów skupienia, w tym do płynów, substancji półstałych, stałych i wosków. Ciecze mogą być wodne lub niewodne; substancje stałe mogą być rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie. W miarę możliwości substancje stałe należy przed zastosowaniem zmielić na drobnoziarnisty proszek; nie jest wymagana żadna wcześniejsza obróbka próbki. W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania modeli badań objętych omawianą metodą badawczą do konkretnej kategorii badanych substancji chemicznych, modeli tych nie należy stosować w odniesieniu do tej konkretnej kategorii badanych substancji chemicznych. Ponadto przyjmuje się, że niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie nie tylko do substancji, ale także do mieszanin. Jednak ze względu na fakt, iż mieszaniny obejmują szeroki zakres kategorii oraz składów, oraz że obecnie dostępna jest niewielka ilość informacji na temat badania mieszanin, w przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania omawianej metody badawczej w odniesieniu do konkretnej kategorii mieszanin (np. kierując się strategią zaproponowaną w (26)), metody tej nie należy stosować w odniesieniu do tej konkretnej kategorii mieszanin. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny. Gazów i aerozoli nie oceniano jeszcze w badaniach walidacyjnych (8)(9)(10). Chociaż nie można wykluczyć, że da się je badać z wykorzystaniem technologii RhE, niniejsza metoda badawcza nie pozwala na badanie gazów i aerozoli.

9. Badane substancje chemiczne pochłaniające światło w takim samym zakresie, jak formazan MTT oraz badane substancje chemiczne, które są w stanie bezpośrednio obniżyć zawartość barwnika przyżyciowego MTT (do formazanu MTT), mogą zakłócać pomiary żywotności tkanki i wymagać zastosowania przystosowanych kontroli w celu korekty. Rodzaj przystosowanych kontroli, który może być wymagany, będzie się różnił w zależności od rodzaju interferencji wywołanych przez badaną substancję chemiczną oraz procedurę zastosowaną w celu pomiaru formazanu MTT (zob. pkt 25–31).

10. Chociaż niniejsza metoda badawcza nie dostarcza wystarczających informacji na temat podrażnienia skóry, należy zauważyć, że metoda badawcza B.46 dotyczy konkretnie badania *in vitro*, powodującego skutki dla zdrowia w postaci podrażnienia skóry, i opiera się na tym samym układzie badawczym RhE, choć z wykorzystaniem innego protokołu (5). Aby dokonać pełnej oceny miejscowego działania na skórę po pojedynczym narażeniu przez skórę, należy zapoznać się z wytycznymi OECD dotyczącymi zintegrowanych podejść do badań i oceny (6). Podejście IATA obejmuje przeprowadzanie badań *in vitro* w kierunku działania żrącego na skórę (takich jak opisano w niniejszej metodzie badawczej) i podrażnienia skóry przed rozważeniem badań na żywych zwierzętach. Uznaje się, że zastosowanie ludzkiej skóry podlega krajowym i międzynarodowym zastrzeżeniom i warunkom etycznym.

ZASADA BADANIA

11. Badana substancja chemiczna jest nanoszona miejscowo na trójwymiarowy model RhE składający się z niezmienionych keratynocytów naskórka pochodzących od człowieka, które poddano hodowli w celu uzyskania wielowarstwowego, wysoce zróżnicowanego modelu ludzkiego naskórka. Model ten składa się z zorganizowanych warstw: podstawnej, kolczystej i ziarnistej oraz z wielopoziomowej warstwy rogowej naskórka zawierającej struktury blaszkowate utworzone z lipidów wypychanych do przestrzeni międzykomórkowej, analogiczne do struktur stwierdzanych *in vivo*.

▼M8

12. Metoda badawcza RhE opiera się na założeniu, że substancje chemiczne są w stanie przeniknąć przez warstwę rogową naskórka na drodze dyfuzji lub w wyniku jej niszczenia i są cytotoksyczne dla leżących głębiej warstw komórek. Żywotność komórek jest mierzona metodą enzymatycznej konwersji barwnika przyżyciowego MTT [bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy, błękit tiazolilowy; numer CAS 298-93-1], w niebieską sól formazanu, którą oznacza się ilościowo po ekstrakcji z tkanek (27). Substancje żrące identyfikuje się na podstawie ich zdolności do zmniejszenia żywotności komórek poniżej określonych wartości progowych (zob. pkt 35 i 36). Okazało się, że oparta na RhE metoda badania działania żrącego na skórę pozwala na prognozowanie skutków takiego działania na skórę *in vivo*, ocenianych u królików zgodnie z metodą badawczą B.4 (2).

WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

13. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania dowolnego z czterech zweryfikowanych modeli badań RhE zgodnych z niniejszą metodą badawczą laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo klasyfikując 12 substancji służących do wykazania biegłości wykazanych w tabeli 1. W przypadku wykorzystania metody do utworzenia niższych jednostek klasyfikacji, należy również wykazać prawidłowy podział na podkategorie. W sytuacji gdy substancja znajdująca się w wykazie jest niedostępna lub w uzasadnionych przypadkach można zastosować inną substancję, dla której dostępne są odpowiednie dane porównawcze z badań *in vivo* i *in vitro* (np. z wykazu referencyjnych substancji chemicznych (24)), pod warunkiem zastosowania tych samych kryteriów wyboru, które opisano w tabeli 1.

Tabela 1

Wykaz substancji służących do wykazania biegłości ([1])

Substancja	Numer CAS	Klasa chemiczna ([2])	Kategoria wg GHS ONZ/ rozporządzenia CLP na podstawie wyników badań *in vivo* ([3])	Kategoria VRM VRM na podstawie wyników badań *in vitro* ([4])	Reduktor MTT ([5])	Stan skupienia
Podkategoria 1A substancji żrących *in vivo*						
Kwas bromooctowy	79-08-3	Kwas organiczny	1A	(3) 1A	—	S
Trójfluorek boru – dwuwodny	13319-75-0	Kwas nieorganiczny	1A	(3) 1A	—	C
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	—	S
Chlorek dichloroacetylu	79-36-7	Elektrofil	1A	(3) 1A	—	C
Kombinacja podkategorii 1B i 1C substancji żrących *in vivo*						
Kwas glioksalowy – jednowodny	563-96-2	Kwas organiczny	1B i 1C	(3) 1B i 1C	—	S
Kwas mlekowy	598-82-3	Kwas organiczny	1B i 1C	(3) 1B i 1C	—	C
Etanoloamina	141-43-5	Zasada organiczna	1B	(3) 1B i 1C	T	Lepka konsystencja

▼**M8**

Substancja	Numer CAS	Klasa chemiczna ([2])	Kategoria wg GHS ONZ/ rozporządzenia CLP na podstawie wyników badań *in vivo* ([3])	Kategoria VRM VRM na podstawie wyników badań *in vitro* ([4])	Reduktor MTT ([5])	Stan skupienia
Podkategoria 1A substancji żrących *in vivo*						
Kwas chlorowodorowy (14,4 %)	7647-01-0	Kwas nieorganiczny	1B i 1C	(3) 1B i 1C	—	C
Substancje niedziałające żrąco *in vivo*						
Bromek fenetylu	103-63-9	Elektrofil	NŻ	(3) NŻ	T	C
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Zasada organiczna	NŻ	(3) NŻ	—	S
4-(metylotio)-benzaldehyd	3446-89-7	Elektrofil	NŻ	(3) NŻ	T	C
Kwas laurynowy	143-07-7	Kwas organiczny	NŻ	(3) NŻ	—	S

Skróty: Numer CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service; VRM = zwalidowana metoda referencyjna; NŻ = nieżrące; T = tak S = stały; C = ciekły

([1]) Substancje służące do wykazania biegłości, podzielone w pierwszej kolejności na substancje mające i niemające działania żrącego, a następnie według podkategorii działania żrącego i klasy chemicznej, wybrano spośród substancji wykorzystanych w badaniach walidacyjnych ECVAM modeli badań EpiSkin™ i EpiDerm™ (8)(9)(10) oraz spośród badań powalidacyjnych na podstawie danych uzyskanych od producentów EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ i epiCS® (23). O ile nie wskazano inaczej, substancje przebadano na wysokim poziomie czystości uzyskanym po nabyciu ich z handlowego źródła (8)(10). Wybór obejmuje – w miarę możliwości – substancje, które: (i) są reprezentatywne dla zakresu reakcji żrących (np. substancje niedziałające żrąco; od słabo do silnie żrących substancji), które można zmierzyć lub przewidzieć za pomocą VRM; (ii) są reprezentatywne dla klas chemicznych wykorzystywanych w badaniach walidacyjnych; (iii) mają dobrze określoną strukturę chemiczną; (iv) dają odtwarzalne wyniki przy użyciu VRM; (v) dają ostateczne wyniki w referencyjnej metodzie badawczej *in vivo*; (vi) są dostępne na rynku; oraz (vii) nie są związane z wygórowanymi kosztami utylizacji.

([2]) Klasa chemiczna przypisana przez Barratta i in. (8).

([3]) Odpowiadające grupy opakowaniowe ONZ dla kategorii 1A, 1B i 1C Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów/rozporządzenia CLP to odpowiednio I, II i III.

([4]) Prognozy *in vitro* uzyskane za pomocą VRM podane w tabeli otrzymano, stosując modele badań (VRM) EpiSkin™ i EpiDerm™ podczas powalidacyjnego badania przeprowadzonego przez producentów tej metody badawczej.

([5]) Przy obliczaniu wartości żywotności otrzymanych w badaniach walidacyjnych w kierunku działania żrącego na skórę ECVAM nie uwzględniono bezpośredniej redukcji MTT (w badaniach walidacyjnych nie wykonano kontroli tkanek martwych). Powalidacyjne dane wygenerowane przez producentów metody badawczej zaprezentowane w tej tabeli otrzymano jednak, wykorzystując dostosowane kontrole (23).

14. W ramach wykazywania efektywności zaleca się, aby użytkownik sprawdził właściwości bariery cechujące tkanki po ich otrzymaniu zgodnie ze wskazaniami producenta modelu RhE. Jest to szczególnie istotne, jeżeli tkanki są wysyłane na duże odległości lub wysyłka trwa długo. Gdy metoda badawcza została z powodzeniem wprowadzona oraz wykazano jej efektywność, weryfikacja taka nie będzie konieczna w ramach rutynowej procedury. W przypadku rutynowego zastosowania metody zaleca się jednak, aby w dalszym ciągu oceniać właściwości bariery w regularnych odstępach czasu.

PROCEDURA

15. Poniższe stanowi ogólny opis składowych i procedur modeli badań RhE służących ocenie działania żrącego na skórę objętej niniejszą metodą badawczą. Modele RhE, które potwierdzono naukowo jako zdatne do wykorzystania w niniejszej metodzie badawczej, tj. modele EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE i epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), można uzyskać ze źródeł komercyjnych. Standardowe procedury operacyjne dla tych czterech modeli RhE są dostępne (34)(35)(36)(37), a ich główne

▼M8

składowe metody badawczej streszczono w dodatku 2. Zaleca się, aby przy wdrażaniu i stosowaniu jednego z tych modeli w laboratorium zapoznać się z odpowiednią standardową procedurę operacyjną. Badanie przy pomocy czterech modeli badań RhE opisanych w niniejszej metodzie badawczej powinno spełniać następujące warunki:

ELEMENTY METODY BADAWCZEJ RHE

Warunki ogólne

16. W celu odtworzenia nabłonka należy użyć niezmienionych keratynocytów pochodzących od człowieka. Pod zachowującą funkcje życiowe warstwą rogową naskórka powinno znajdować się kilka warstw żywych komórek nabłonka (warstwa podstawna, warstwa kolczysta, warstwa ziarnista). Warstwa rogowa naskórka powinna być wielopoziomowa i powinna zawierać lipidy niezbędne do utworzenia czynnościowej bariery na tyle wytrzymałej, aby uniemożliwiała szybkie przenikanie cytotoksycznych wzorcowych substancji chemicznych, np. soli sodowej siarczanu dodecylu (SDS) lub markera Triton X-100. Funkcję bariery należy wykazać i można ocenić albo poprzez ustalenie stężenia, w którym wzorcowa substancja chemiczna zmniejsza żywotność tkanek o 50 % (IC_{50}) po ustalonym czasie narażenia na działanie, albo poprzez ustalenie czasu narażenia na działanie potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % (ET_{50}) po zastosowaniu wzorcowej substancji chemicznej w określonym, stałym stężeniu (zob. pkt 18). Właściwości izolacyjne modelu RhE powinny zapobiegać przechodzeniu materiału przez warstwę rogową naskórka do żywej tkanki, gdyż w innym razie modelowanie narażenia skóry mogłoby być niewłaściwe. Model RhE nie powinien być skażony bakteriami, wirusami, mykoplazmą ani grzybami.

Warunki funkcjonalne

Żywotność

17. Testem stosowanym do określenia ilościowego żywotności tkanki jest próba MTT (27). Komórki żywotne wytworu tkankowego RhE redukują barwnik przyżyciowy MTT do wytrąconego niebieskiego formazanu MTT, który jest później ekstrahowany z komórki przy użyciu izopropanolu (lub podobnego rozpuszczalnika). OD samego rozpuszczalnika do ekstrakcji powinna być wystarczająco niska, tj. OD < 0,1. Ekstrahowany formazan MTT można określić ilościowo, stosując pomiar absorbancji wzorca (OD) albo procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC (38). Użytkownicy modelu RhE powinni zapewnić zgodność każdej partii zastosowanego modelu RhE z określonymi kryteriami kontroli ujemnej. Zakres dopuszczalności (górna i dolna granica) kontroli ujemnej wartości OD powinien zostać określony przez producentów/dostawców modelu RhE. Zakresy dopuszczalności kontroli ujemnej wartości OD dla czterech zweryfikowanych modeli badań RhE uwzględnionych w niniejszej metodzie badawczej podano w tabeli 2. Użytkownik spektrofotometrii HPLC/UPLC powinien stosować kontrolę ujemną zakresów OD określonych w tabeli 2 jako warunku dopuszczenia kontroli ujemnej. Należy udokumentować, że tkanki poddane zabiegowi w ramach kontroli ujemnej są stabilne w hodowli (umożliwiają podobne pomiary OD) przez cały okres narażenia.

Tabela 2

Zakresy dopuszczalności dla kontroli ujemnej wartości OD do kontroli jakości partii

	Dolna granica dopuszczalności	Górna granica dopuszczalności
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

▼M8

Funkcja bariery

18. Warstwa rogowa naskórka i wchodzące w jej skład lipidy powinny być na tyle odporne, aby nie było możliwe szybkie przenikanie przez nie niektórych cytotoksycznych wzorcowych substancji chemicznych (np. SDS lub markera Triton X-100) według oceny na podstawie IC_{50} lub ET_{50} (tabela 3). Producent/dostawca modelu RhE powinien w momencie dostarczenia tkanek użytkownikowi końcowemu wykazać funkcję bariery każdej partii zastosowanego modelu RhE (zob. pkt 21).

Morfologia

19. Badanie histologiczne modelu RhE należy przeprowadzić z wykazaniem istnienia wielowarstwowej struktury przypominającej ludzki naskórek zawierający warstwę podstawną, warstwę kolczystą, warstwę ziarnistą i warstwę rogową, oraz wykazać profil lipidowy podobny do profilu lipidowego ludzkiego naskórka. Producent/dostawca modelu RhE powinien w momencie dostarczenia tkanek użytkownikowi końcowemu przedłożyć badania histologiczne każdej partii modelu RhE wykorzystanego do wykazania odpowiedniej morfologii tkanek (zob. pkt 21).

Odtwarzalność

20. Użytkownicy metody badawczej powinni wykazać odtwarzalność metody badawczej w czasie z dodatnimi i ujemnymi kontrolami. Ponadto metodę badawczą należy stosować wyłącznie w przypadku, gdy producent/dostawca modelu RhE dostarczy dane potwierdzające odtwarzalność w czasie z zastosowaniem żrących i nieżrących substancji chemicznych, np. ujętych w wykazie substancji służących do wykazania biegłości (tabela 1). W przypadku wykorzystania metody badawczej do utworzenia niższych jednostek klasyfikacji, należy również wykazać odtwarzalność w odniesieniu do podkategorii.

Kontrola jakości (QC)

21. Model RhE należy stosować jedynie w przypadku, gdy producent bądź dostawca wykaże, że każda partia wykorzystywanego modelu RhE spełnia określone kryteria zwolnienia do produkcji, spośród których te dotyczące żywotności (pkt 17), funkcji bariery (pkt 18) i morfologii (pkt 19) są najbardziej istotne. Dane te są przekazywane użytkownikom metody badawczej, tak aby mogli oni uwzględnić tę informację w sprawozdaniu z badania. Jedynie wyniki otrzymane z partii tkanek zatwierdzonych przez kontrolę jakości mogą być dopuszczone do wiarygodnej prognozy klasyfikacji substancji żrących. Zakres dopuszczalności (górna i dolna granica) IC_{50} lub ET_{50} określa producent/dostawca modelu RhE. Zakresy dopuszczalności czterech zweryfikowanych modeli badań podano w tabeli 3.

Tabela 3

Kryteria zwolnienia serii na podstawie kontroli jakości

	Dolna granica dopuszczalności	Górna granica dopuszczalności
EpiSkin™ (SM) (poddawanie działaniu SDS przez 18 godzin) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 godziny	ET_{50} = 8,7 godziny
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET_{50} = 4,0 godziny	ET_{50} = 10,0 godzin
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET_{50} = 2,0 godziny	ET_{50} = 7,0 godzin

▼M8

Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej

22. Należy użyć co najmniej dwóch kontrprób tkanki dla każdej badanej substancji chemicznej i prób kontrolnych w każdym okresie narażenia. W przypadku płynnych i stałych substancji należy nałożyć na skórę dostateczną ilość substancji badanej, tak aby równomiernie pokrywała powierzchnię naskórka, unikając jednak nakładania dawki nieskończonej, tj. należy użyć co najmniej 70 $\mu L/cm^2$ lub 30 mg/cm^2. W zależności od modelu przed nałożeniem stałych substancji chemicznych należy zwilżyć powierzchnię naskórka wodą dejonizowaną lub destylowaną w celu poprawy kontaktu między badaną substancją chemiczną i powierzchnią naskórka (34)(35)(36)(37). W miarę możliwości substancje stałe powinny być badane w postaci drobnoziarnistego proszku. Sposób podania powinien być odpowiedni dla badanej substancji chemicznej (zob. np. pozycje z literatury (34–37)). Pod koniec okresu narażenia substancję badaną należy ostrożnie zmyć z naskórka roztworem buforowym lub 0,9 % NaCl. Zależnie od tego, która z trzech zatwierdzonych metod z wykorzystaniem RhE jest stosowana, wykorzystuje się dwa lub trzy okresy narażenia na badaną substancję chemiczną (w przypadku wszystkich czterech zweryfikowanych modeli RhE: 3 minuty i 1 godzina; w przypadku EpiSkin™ dodatkowe 4 godziny czasu narażenia). Zależnie od wykorzystanego modelu badania RhE i ocenianego okresu narażenia temperatura inkubacji podczas narażenia może się wahać od temperatury pokojowej do 37 °C.

23. W każdej serii badawczej należy zastosować jednoczesną kontrolę ujemną i kontrolę dodatnią (PC), aby wykazać, że żywotność (przy NC), funkcja bariery i ostateczna czułość tkankowa (przy PC) mieszczą się w dopuszczalnym zakresie zdefiniowanym na podstawie danych historycznych. W zależności od zastosowanego modelu RhE jako substancji do kontroli pozytywnej zaleca się użycie kwasu octowego lodowatego lub 8N KOH. Należy zauważyć, że 8N KOH stanowi bezpośredni reduktor MTT, który może wymagać dostosowania kontroli zgodnie z opisem z pkt 25 i 26. Zalecanymi substancjami w kontroli ujemnej są 0,9 % NaCl lub woda.

Pomiary żywotności komórek

24. Test ilościowy MTT należy wykorzystywać do pomiarów żywotności komórek w ramach niniejszej metody badawczej (27). Próbkę tkanki umieszcza się w roztworze MTT o właściwym stężeniu (np. 0,3–1 mg/ml) na 3 godziny. Wytrącony niebieski produkt formazanowy ekstrahuje się następnie z tkanki przy użyciu rozpuszczalnika (np. izopropanolu, kwaśnego izopropanolu) i mierzy się stężenie formazanu poprzez oznaczenie OD przy długości fali 570 nm, wykorzystując filtr w paśmie maksimum ± 30 nm lub z zastosowaniem procedury spektrofotometrii HPLC/UPLC (zob. pkt 30 i 31) (38).

25. Badane substancje chemiczne mogą zakłócać test MTT na skutek bezpośredniej redukcji MTT do niebieskiego formazanu albo na skutek zakłócenia barw, jeżeli badana substancja chemiczna jest chłonna, w sposób naturalny lub w wyniku procedur poddania działaniu badanej substancji w tym samym zakresie formazanu pod względem gęstości optycznej (570 ± 30 nm, głównie niebieskich i fioletowych substancji chemicznych). Należy użyć dodatkowych kontroli w celu wykrycia i uwzględnienia potencjalnej interferencji tych badanych substancji chemicznych, takiej jak kontrola nieswoistej redukcji MTT (NSMTT) i kontrola o barwie nieswoistej (NSC) (zob. pkt 26–30). Jest to istotne zwłaszcza w przypadku niecałkowitego usunięcia określonej substancji badanej z tkanki przez przemywanie lub gdy substancja ta przeniknie przez naskórek, przez co pozostaje obecna w tkankach podczas przeprowadzania badania żywotności MTT. Szczegółowy opis korekty bezpośredniej redukcji MTT i zakłóceń przez barwniki jest dostępny w standardowych procedurach operacyjnych dotyczących modeli badań (34)(35)(36)(37).

▼M8

26. W celu identyfikacji bezpośrednich reduktorów MTT każdą badaną substancję chemiczną należy dodać do świeżo przygotowanej pożywki MTT (34)(35)(36)(37). Jeżeli mieszanina MTT zawierająca badaną substancję chemiczną zmieni barwę na niebieską/fioletową, zakłada się, że badana substancja chemiczna bezpośrednio redukuje MTT i należy przeprowadzić pogłębioną kontrolę funkcjonalną niezdolnego do życia naskórka, stosując niezależnie pomiar absorbancji wzorca (OD) lub procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC. Do tej dodatkowej kontroli funkcjonalnej używa się martwych tkanek, które wykazują jedynie resztkową aktywność metaboliczną, ale wchłaniają badaną substancję chemiczną w podobnym stopniu co tkanki żywotne. Każda substancja chemiczna redukująca MTT nanoszona jest na co najmniej dwie kontrpróby martwych tkanek na czas narażenia, które przechodzą pełne badanie działania żrącego na skórę. Następnie oblicza się rzeczywistą żywotność jako odsetek żywotności tkanek uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie reduktora MTT pomniejszony o odsetek nieswoistej redukcji MTT uzyskany w wyniku narażenia martwych tkanek na działanie tego samego reduktora MTT, obliczony relatywnie względem kontroli ujemnej prowadzonej jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSMTT).

27. W celu identyfikacji potencjalnego zakłócenia przez barwne badane substancje chemiczne lub przez badane substancje chemiczne, które zabarwiają się w kontakcie z wodą lub izopropanolem, i podjęcia decyzji co do potrzeby dodatkowych kontroli, należy przeprowadzić analizę widmową badanej substancji chemicznej w wodzie (środowisko podczas narażenia) lub izopropanolu (roztwór ekstrakcyjny). Jeżeli w wodzie lub izopropanolu badana substancja chemiczna chłonie światło w zakresie 570 ± 30 nm, należy przeprowadzić pogłębione kontrole z barwnikiem lub, alternatywnie, procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC, w przypadku której te kontrole nie są wymagane (zob. pkt 30 i 31). Podczas dokonywania pomiaru absorbancji wzorca każda zakłócająca, barwiona badana substancja chemiczna nakładana jest na każdy okres narażenia na co najmniej dwie kontrpróby żywych tkanek, które podlegają pełnemu badaniu w kierunku działania żrącego na skórę, ale są inkubowane z pożywką zamiast roztworu MTT podczas etapu inkubacji z MTT w celu uzyskania kontroli o barwie nieswoistej (NSC_{living}). Ze względu na naturalną różnorodność biologiczną żywych tkanek kontrolę NSC_{living} należy przeprowadzać równocześnie na każdy czas narażenia na każdą barwioną badaną substancję chemiczną (w każdej serii badawczej). Następnie oblicza się rzeczywistą żywotność jako odsetek żywotności uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie zakłócającej badanej substancji chemicznej i inkubowanych z roztworem MTT pomniejszony o odsetek tkanek nieswoistej barwy uzyskanych w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie zakłócającej badanej substancji chemicznej i inkubowanych z pożywką bez udziału MTT, w badaniu przeprowadzonym jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSC_{living}).

28. Badane substancje chemiczne, które zidentyfikowano jako powodujące zarówno bezpośrednią redukcję MTT (zob. pkt 26), jak i zakłócenia barwy (zob. pkt 27), będą również wymagały trzeciego zestawu kontroli, oprócz kontroli NSMTTT i NSC_{living} opisanych w poprzednich punktach, podczas wykonywania standardowego pomiaru absorbancji (OD). Dzieje się tak zazwyczaj w przypadku badanych substancji chemicznych o ciemnym zabarwieniu, która interferują z testem MTT (np. niebieski, fioletowy, czarny), ponieważ, jak opisano w pkt 26, ich swoista barwa utrudnia ocenę zdolności do bezpośredniego zmniejszenia MTT. Te badane substancje chemiczne mogą wiązać się zarówno z tkankami martwymi, jak i żywymi, a zatem kontrola NSMTT może nie tylko korygować bezpośrednią redukcję MTT przez badaną substancję chemiczną, ale również zakłócenia barwy wynikające z wiązania się badanej substancji chemicznej z martwymi tkankami. Może to prowadzić do podwójnej korekty zakłóceń koloru, ponieważ kontrola NSC_{living} już koryguje zakłócenia barwy wynikające z połączenia badanej substancji chemicznej z żywymi tkankami. Aby uniknąć podwójnej korekty możliwej w przypadku zakłócenia barwy, należy przeprowadzić trzecią kontrolę nieswoistego zabarwienia w martwych tkankach. W tej dodatkowej kontroli badana substancja chemiczna nanoszona jest co najmniej na dwie kontrpróby martwych tkanek na każdy czas narażenia, które podlegają pełnemu badaniu, ale są inkubowane z pożywką zamiast z roztworem MTT w trakcie etapu inkubacji z MTT. Pojedyncza kontrola NSC_{killed} jest wystarczająca dla każdej badanej substancji chemicznej,

▼M8

niezależnie od liczby przeprowadzonych niezależnych badań/analiz, lecz powinna być przeprowadzana jednocześnie z kontrolą NSMTT, i o ile to możliwe, z wykorzystaniem tej samej partii tkanki. Następnie oblicza się rzeczywistą żywotność jako odsetek żywotności tkanek uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie badanej substancji chemicznej pomniejszony o %NSMTT i $\%NSC_{living}$, powiększony o odsetek barwy nieswoistej uzyskanej w wyniku narażenia martwych tkanek na zakłócającą badaną substancją chemiczną i inkubowanych w podłożu bez MTT, obliczony relatywnie względem kontroli ujemnej przeprowadzonej jednocześnie z korygowanym badaniem ($\%NSC_{killed}$).

29. Należy zauważyć, że nieswoista redukcja MTT i nieswoiste zakłócenia barwy mogą powodować większe odczyty ekstraktu tkankowego powyżej zakresu liniowości spektrofotometru. Na tej podstawie każde laboratorium przed rozpoczęciem badania badanych substancji chemicznych do celów regulacyjnych powinno określić liniowość zakresu spektrofotometru przy użyciu formazanu MTT (CAS # 57360-69-7) pochodzącego ze źródła komercyjnego. W szczególności pomiar absorbancji wzorca (OD) przy użyciu spektrofotometru jest właściwy do oceny bezpośrednich reduktorów MTT i substancji chemicznych zakłócających barwę, gdy OD ekstraktów tkankowych uzyskanych za pomocą badanej substancji chemicznej bez korekty na bezpośrednią redukcję MTT lub zakłócenie barwy mieszczą się w liniowym zakresie spektrofotometru lub gdy nieskorygowana procentowa żywotność uzyskana za pomocą badanej substancji chemicznej zdefiniowana została już jako działająca żrąco na skórę (zob. pkt 35 i 36). Niemniej jednak, wyniki dla badanych substancji chemicznych produkujących %NSMTTT lub $\%NSC_{living} > 50$ % kontroli ujemnej powinny być przyjmowane z ostrożnością.

30. W przypadku barwnych badanych substancji chemicznych, które nie są zgodne z pomiarem absorbancji wzorca (OD) ze względu na zbyt silną interferencję z testem MTT, można zastosować alternatywną procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC- spektrofotometrii do pomiaru formazanu MTT (zob. pkt 31) (37). System spektrofotometrii HPLC/UPLC pozwala na rozdzielenie formazanu MTT od badanej substancji chemicznej przed jej oznaczeniem ilościowym (38). Z tego powodu kontrole NSC_{living} lub NSC_{killed} nie są nigdy wymagane, gdy wykorzystuje się spektrofotometrię HPLC/UPLC, niezależnie od badanej substancji chemicznej. Kontrole NSMTT powinny być jednak stosowane, jeżeli istnieje podejrzenie, że badana substancja chemiczna bezpośrednio obniża MTT lub ma barwę, która utrudnia ocenę zdolności do bezpośredniego zmniejszenia MTT (jak opisano w pkt 26). W przypadku stosowania spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT procent żywotności tkanek oblicza się jako procent MTT powierzchni piku formazanu uzyskanej z żywych tkanek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej w stosunku do piku formazanu MTT uzyskanego przy równoczesnej kontroli ujemnej. W przypadku badanych substancji chemicznych zdolnych do bezpośredniego obniżenia MTT rzeczywistą żywotność tkanek oblicza się jako odsetek żywotności tkanek uzyskanych w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie badanej substancji chemicznej minus %NSMTT. Na koniec należy zauważyć, że bezpośrednie reduktory MTT, które mogą również zakłócać barwę, są zatrzymywane w tkankach po obróbce i obniżają MTT tak znacznie, że prowadzą do OD (przy użyciu pomiaru wzorca OD) lub obszarów pików (przy użyciu spektrofotometrii UPLC/HPLC) badanych ekstraktów tkankowych wykraczających poza zakres liniowości spektrofotometru, których nie można ocenić, chociaż oczekuje się, że będą występować tylko w bardzo rzadkich sytuacjach.

▼M8

31. Spektrofotometria HPLC/UPLC może być również stosowana ze wszystkimi rodzajami badanych substancji chemicznych (barwne, niekolorowe, reduktory MTT i reduktory MTT) do pomiaru formazanu MTT (38). Z powodu zróżnicowania systemów spektrofotometrii HPLC/UPLC, należy wykazać kwalifikację systemu spektrofotometrii HPLC/UPLC przed jego zastosowaniem, aby określić ilościowo formazan MTT z ekstraktów tkankowych poprzez spełnienie kryteriów dopuszczalności zestawu standardowych parametrów kwalifikacyjnych w oparciu na kryteriach opisanych w wytycznych Agencji Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych dotyczących przemysłu walidacji metodą bioanalityczną (38) (39). Te kluczowe parametry i kryteria ich dopuszczalności przedstawiono w dodatku 4. Po spełnieniu kryteriów dopuszczalności określonych w dodatku 4, system spektrofotometrii HPLC/UPLC uznaje się za kwalifikowany i gotowy do pomiaru formazanu MTT w warunkach doświadczalnych opisanych w niniejszej metodzie badawczej.

Kryteria dopuszczalności

32. Dla każdej metody badawczej wykorzystującej ważne modele RhE, tkanki poddane działaniu kontroli ujemnej powinny wykazywać OD odzwierciedlające jakość tkanek, jak opisano w tabeli 2, i nie powinny mieć wartości poniżej historycznie ustalonych granic. Tkanki poddane działaniu PC, tj. kwasu octowego lodowatego lub 8N KOH, powinny odzwierciedlać zdolność tkanek do reagowania na żrące substancje chemiczne w warunkach modelu badania (zob. dodatek 2). Zmienność pomiędzy kontrpróbami tkanek badanych substancji chemicznych lub kontrolnych powinna mieścić się w akceptowalnych granicach dla każdego ważnego wzoru RhE (zob. dodatek 2) (np. różnica żywotności pomiędzy dwoma kontrpróbami tkanek nie powinna przekraczać 30 %). Jeżeli kontrola ujemna lub PC wchodzące w skład serii badawczej zmieszczą się w przyjętych zakresach, serię tę uznaje się za niekwalifikowaną i należy ją powtórzyć. Jeżeli zmienność badanych substancji chemicznych wychodzi poza określony przedział, należy powtórzyć badanie.

Interpretacja wyników i model prognozowania

33. Wartości OD otrzymane dla każdej badanej substancji chemicznej mogą być wykorzystane do obliczenia procentowej żywotności w stosunku do kontroli ujemnej, dla której przyjmuje się 100 %. W przypadku spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT, procent żywotności tkanek oblicza się jako procent MTT powierzchni piku formazanu uzyskanej z żywych tkanek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej w stosunku do piku formazanu MTT uzyskanego przy jednoczesnej kontroli ujemnej. Wartości granicy odcięcia procentowego żywotności komórek rozróżniające żrącą badaną substancję chemiczną od substancji niemającej działania żrącego (lub rozróżniające różne podkategorie żrące) określono poniżej w pkt 35 i 36 dla każdego z modeli badań objętych niniejszą metodą badawczą i powinny być stosowane do interpretacji wyników.

34. Pojedyncza seria badawcza, w skład której wchodzą co najmniej dwie kontrpróby tkanek, powinna wystarczyć dla badanej substancji chemicznej, jeśli otrzymana klasyfikacja jest jednoznaczna. W przypadku wyników granicznych, np. niezgodności powtarzalnych pomiarów można jednak rozważyć przeprowadzenie drugiej serii badawczej, jak również trzeciej w przypadku niezgodności między wynikami dwóch pierwszych serii.

35. W tabeli 4 przedstawiono związany z systemem klasyfikacji Globalnego Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów / rozporządzenia CLP model prognozowania dotyczący modelu badania działania żrącego na skórę EpiSkin™ (9)(34)(22).

▼M8

Tabela 4

Model prognozowania EpiSkin™

Żywotność mierzona po punktach czasowych narażenia (t = 3, 60 oraz 240 minut)	Rozważana prognoza
< 35 % po 3 minutach narażenia	**Substancja żrąca:** • Dodatkowa podkategoria 1A (*)
≥ 35 % po 3 minutach narażenia **ORAZ** < 35 % po 60 minutach narażenia **LUB** ≥ 35 % po 60 minutach narażenia **ORAZ** < 35 % po 240 minutach narażenia	**Substancja żrąca:** • Połączenie dodatkowych podkategorii 1B- oraz -1C
≥ 35 % po 240 minutach narażenia	**Substancja nieżrąca**

(*) Zgodnie z danymi wygenerowanymi w celu oceny przydatności modeli testowych RhE do wspierania podkategorii wykazano, że około 22 % wyników badania modelu EpiSkin™ podkategorii 1A może faktycznie stanowić podkategorię 1B lub podkategorię 1C substancji/mieszanin (zawyżona klasyfikacja) (zob. dodatek 3).

36. W tabeli 5 przedstawiono modele prognozowania dla EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), SkinEthic™ RHE (17)(18)(23)(36) i epiCS® (16)(23)(37) modele badania działania żrącego na skórę, powiązane z systemem klasyfikacji GHS ONZ/rozporządzeniem CLP:

Tabela 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ zrekonstruowany ludzki naskórek oraz epiCS®

Żywotność mierzona po punktach czasowych narażenia (t = 3, oraz 60 minut)	Rozważana prognoza
ETAP 1 w przypadku EpiDerm™ SCT – zrekonstruowany ludzki naskórek SkinEthic™ oraz epiCS®	
< 50 % po 3 minutach narażenia	**Substancja żrąca:**
≥ 50 % po 3 minutach narażenia **ORAZ** < 15 % po 60 minutach narażenia	**Substancja żrąca:**
≥ 50 % po 3 minutach narażenia **ORAZ** ≥ 15 % po 60 minutach narażenia	**Substancja nieżrąca**
ETAP 2 w przypadku EpiDerm™ SCT – substancje/mieszaniny zidentyfikowane jako żrące w kroku 1	
< 25 % po 3 minutach narażenia	Dodatkowa podkategoria 1A*
≥ 25 % po 3 minutach narażenia	Połączenie dodatkowych podkategorii 1B i 1C
ETAP 2 w przypadku SkinEthic™ RHE – substancje/mieszaniny zidentyfikowane jako żrące w kroku 1	
< 18 % po 3 minutach narażenia	Dodatkowa podkategoria 1A*

▼M8

Żywotność mierzona po punktach czasowych narażenia (t = 3, oraz 60 minut)	Rozważana prognoza
ETAP 1 w przypadku EpiDerm™ SCT – zrekonstruowany ludzki naskórek SkinEthic™ oraz epiCS®	
≥ 18 % po 3 minutach narażenia	Połączenie dodatkowych podkategorii 1B i 1C
ETAP 2 w przypadku epiCS® – substancje/mieszaniny zidentyfikowane jako żrące w kroku 1	
< 15 % po 3 minutach narażenia	Dodatkowa podkategoria 1A*
≥ 15 % po 3 minutach narażenia	Połączenie dodatkowych podkategorii 1B i 1C

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

37. W przypadku każdego badania należy przedstawić w formie tabelarycznej, z uwzględnieniem w stosownych przypadkach danych z powtórzonych eksperymentów, dane z poszczególnych kontrprób tkanek (np. dane dotyczące wartości OD i obliczonej procentowej żywotności komórek dla każdej substancji badanej, łącznie z klasyfikacją). Ponadto w odniesieniu do każdego badania należy zgłosić średnie i zakresy żywotności oraz CV pomiędzy kontrpróbami tkanki. W odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej należy zgłosić zaobserwowane interakcje bezpośrednich reduktorów MTT lub barwnych substancji chemicznych z odczynnikiem MTT.

Sprawozdanie z badania

38. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badane i kontrolne substancje chemiczne:

— Substancja jednoskładnikowa: dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina: opisana w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników;

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i wszelkie dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— źródło, numer partii (jeżeli dostępny);

— w stosownych przypadkach obróbka badanej substancji chemicznej/substancji kontrolnej przed badaniem (np. ogrzanie, rozdrobnienie);

— stabilność badanej substancji chemicznej, termin przydatności lub data ponownej analizy, jeżeli są znane;

— warunki przechowywania.

Zastosowany model i protokół RhE oraz jego uzasadnienie (w stosownych przypadkach)

Warunki badania:

— zastosowany model RhE (w tym numer partii);

▼**M8**

— Informacje na temat wzorcowania urządzenia pomiarowego (np. *spektrofotometru*), długość fali i filtr środkowoprzepustowy (w stosownych przypadkach) stosowany do określenia ilościowego formazanu MTT oraz zakres liniowości urządzenia pomiarowego;

— opis metody wykorzystanej do oceny ilościowej formazanu MTT;

— opis dopuszczalności systemu spektrofotometrycznego HPLC/UPLC, w stosownych przypadkach;

— pełne informacje podstawowe na temat stosowanego modelu RhE, z uwzględnieniem jego efektywności. Powinno to między innymi obejmować:

i) żywotność;

ii) funkcję ochronną;

iii) morfologię;

iv) odtwarzalność i zdolność predykcyjną;

v) kontrole jakości (QC) modelu;

— odniesienie do danych historycznych modelu. Powinno to między innymi obejmować dopuszczalność danych QC z odwołaniem do danych dotyczących serii historycznych;

— wykazanie biegłości w stosowaniu metody badawczej przed rutynowym użyciem w drodze badania substancji służących do wykazania biegłości.

Procedura badawcza:

— szczegóły wykorzystanej procedury badania (w tym procedury mycia sprzętu stosowane po okresie narażenia),

— Dawki wykorzystanych badanych substancji chemicznych i kontrolnych substancji chemicznych;

— Czas trwania okresu lub okresów narażenia oraz temperatura lub temperatury narażenia;

— wskazanie prób kontroli używanych w odniesieniu do bezpośrednich reduktorów MTT lub badanych substancji chemicznych, które w wyniku reakcji przechodzą w barwny produkt, w stosownych przypadkach;

— Liczba kontrprób tkanek wykorzystanych do badanej substancji chemicznej i kontroli (PC, kontrola ujemna, NSMTT, NSC_{living} i NSC_{killed}, jeśli dotyczy), na czas narażenia;

— opis zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji/modelu prognozowania na podstawie wykorzystanego modelu RhE;

— Opis wszelkich modyfikacji w procedurze badawczej (w tym w procedurach mycia).

Kryteria dopuszczalności badania i serii badawczej:

— średnie wartości oraz zakresy dopuszczalności dodatniej i ujemnej kontroli na podstawie danych historycznych;

— dopuszczalna zmienność wśród kontrprób tkanek w przypadku dodatniej i ujemnej kontroli;

▼M8

— dopuszczalna zmienność wśród kontrprób tkanek w przypadku badanej substancji chemicznej.

Wyniki:

— Tabelaryczne zestawienie danych dla poszczególnych badanych substancji chemicznych i kontroli, dla każdego okresu narażenia, każdej serii badawczej i każdego pomiaru kontrpróby, w tym powierzchni piku OD lub formazanu MTT, procentu żywotności tkanek, średniego procentu żywotności tkanek, różnic między kontrpróbami, SD lub CV, jeżeli dotyczy;

— W stosownych przypadkach wyniki kontroli używanych w odniesieniu do bezpośrednich reduktorów MTT lub badanych substancji chemicznych, które w wyniku reakcji przechodzą w barwny produkt, w tym OD lub MTT powierzchni piku formazanu, % NSMTT, % NSC_{living}, %NSC_{killed}, różnic pomiędzy kontrpróbami tkanki, SD lub CV (w stosownych przypadkach) oraz ostateczny prawidłowy odsetek żywotności tkanki;

— Wyniki uzyskane z zastosowaniem badanych substancji chemicznych i kontrolnych substancji chemicznych w odniesieniu do określonych kryteriów dopuszczalności badania i serii badawczej;

— opis innych zaobserwowanych skutków;

— ustalona na tej podstawie klasyfikacja w odniesieniu do modelu prognozowania lub zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji.

Omówienie wyników

Wnioski

BIBLIOGRAFIA

(1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2013), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie piąte zmienione; Nowy Jork oraz Genewa: Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Rozdział B.4 niniejszego załącznika, Ostre działanie drażniące na skórę.

(3) Rozdział B.40 niniejszego załącznika, *Badanie działania żrącego na skórę in vitro:*

(4) Rozdział B.65 niniejszego załącznika, *Metoda badawcza bariery membranowej in vitro.*

(5) Rozdział B.46 niniejszego załącznika, *Badanie podrażnień skóry* in vitro*: Metoda badania z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka.*

(6) OECD (2014). *Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion.* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 203. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, 2014.

(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., i Balls M. (1995). *A Prevalidation Study on* In Vitro *Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.* „ALTA" nr 23, s. 219–255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P. i Worth A.P. (1998). *The ECVAM International Validation Study on* In Vitro *Tests for Skin Corrosivity.* 1. Selection and distribution of the test chemicals. „Toxicology In Vitro" nr 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. i 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*" nr 12: 483–524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. i 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. i Zucco F. (1995). *Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures.* The report and Recommendations of ECVAM Workshops, „ALTA" nr 23, s. 129–147.

(12) ICCVAM (Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych) (1997), Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. Publikacja NIH nr 97-3981, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, Karolina Północna, Stany Zjednoczone.

(13) ICCVAM (Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych) (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" nr 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, Stany Zjednoczone.

(14) EC-ECVAM (1998). *Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an In Vitro Test for Skin Corrosivity).* ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 kwietnia 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 marca 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. i Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-*A New Reconstructed Epidermis for In Vitro Skin Corrosivity Testing*. „Toxicology In Vitro" nr 19, s. 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., i 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.* „Toxicology In Vitro" nr 20, s 547–559.

(18) Tornier C., Roquet M. i 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.* nr 24, s. 1379–1385.

(19) EC-ECVAM (2006). *Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25)*, 17 listopada 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). *ESAC Statement on the Scientific Validity of an* In-Vitro *Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30)*, 12 czerwca 2009.

▼**M8**

(21) OECD (2013). *Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation.* [W:] *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 190). Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., i 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.* nr 28, s. 131–145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., i Fuchs, H. (2015). *Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. Toxicol.* nr 29, s. 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.* [W:] *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 219). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(25) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment..* [W:] *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (nr 34). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). *Regulatory Assessment of In Vitro Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. „Regulatory Toxicology and Pharmacology"* nr 62, s. 393–403.

(27) Mosmann T. (1983). *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. „Journal of Immunological Methods"* nr 65, s. 55–63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). *The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human Epidermis* In Vitro.. [W:] „*In Vitro* Skin Toxicology" A. Rougier, Goldberg A.M i Maibach H.I. (red.), s. 133–140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. i Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. „Toxicology *In Vitro*" nr 8, s. 889–891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J i Mommaas M. (2000). *Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models.* „International Journal of Pharmaceutics " nr 203, s. 211–225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. i 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.* „Experimental Cell Research" nr 193, s. 310–319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS i Rosenberg M. (1992). *The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. „Cytotechnology"* nr 9, s. 163–171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF i Parenteau N.L. (1994). *Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. „Biotechnology and Bioengineering"* nr 43/8, s. 747–756.

(34) EpiSkin™ SOP (grudzień 2011). *INVITTOX Protocol (nr 118), EpiSkin™ Skin Corrosivity Test*.

(35) EpiDerm™ SOP (luty 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 (styczeń 2012). *INVITTOX Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test*.

(37) EpiCS® SOP (styczeń 2012). *Version 4.1* In Vitro *Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems*.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol.* nr 29, s. 741–761.

(39) US FDA (2001). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.* U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, maj 2001. Dostępne na stronie internetowej: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼M8

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności wyników zastosowanej metody badawczej z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na określenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (25).

Żywotność komórek: parametr określający całkowitą aktywność populacji komórek, np. zdolność dehydrogenaz w mitochondriach komórek do obniżenia zawartości barwnika przyżyciowego MTT, (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy) który, w zależności od pomiaru końcowego i zastosowanego schematu badania odpowiada całkowitej liczbie lub żywotności komórek.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Zgodność: jest to miara efektywności metody badawczej w odniesieniu do metod badawczych, które dają wyniki kategoryczne i jest ona jednym z aspektów istotności. To określenie jest czasami stosowane wymiennie z określeniem „dokładność"; definiuje się jako odsetek wszystkich badanych substancji chemicznych, które są prawidłowo sklasyfikowane jako dodatnie lub ujemne. Zgodność jest w dużym stopniu uzależniona od przewagi dodatnich wyników w rodzajach badanej substancji chemicznej (25).

ET_{50}: może być oszacowane przez ustalenie czasu narażenia na działanie potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % po zastosowaniu wzorcowej substancji chemicznej w określonym, stałym stężeniu, zob. również IC_{50}.

GHS (Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (1).

HPLC: wysokosprawna chromatografia cieczowa.

IATA: zintegrowane podejście do badań i oceny.

IC_{50}: może być oszacowane w drodze ustalenia stężenia, w którym wzorcowa substancja chemiczna powoduje zmniejszenie żywotności tkanek o 50 % (IC_{50}) po stałym czasie narażenia na działanie, zob. również ET_{50}.

Dawka nieskończona: ilość substancji badanej nakładana na skórę, przekraczająca ilość konieczną do całkowitego, jednolitego pokrycia jej powierzchni.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji niewchodzących ze sobą w reakcję.

Substancja jednoskładnikowa: substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

▼M8

MTT: bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy MTT.

Substancja wieloskładnikowa: substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu > 10 % (w/w) i < 80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się w wyniku zmieszania co najmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

NŻ: substancja niemająca działania żrącego.

Kontrola NSC_{killed}: kontrola o barwie nieswoistej martwych tkanek.

Kontrola NSC_{living}: kontrola o barwie nieswoistej żywych tkanek.

NSMTT: nieswoista redukcja MTT.

OD: gęstość optyczna (ang. Optical Density).

PC: Kontrola dodatnia – kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża.

Standardy wykonywania badań: normy oparte na zwalidowanej metodzie badania, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badawczej, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: (i) zasadnicze elementy metody badawczej; (ii) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania dopuszczalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz (iii) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badawczej, który proponowana metoda badania powinna osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia (25).

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono istotne i użyteczne dla konkretnego celu. Jest to zakres, w jakim metoda badawcza prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badawczej (25).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną (25).

Seria badawcza: seria badawcza obejmuje przynajmniej jedną badaną substancję chemiczną, która badana jest równocześnie z kontrolą ujemną i kontrolą dodatnią.

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (25).

▼**M8**

Działanie żrące na skórę *in vivo*: powstanie nieodwracalnego uszkodzenia skóry; tj. widocznej martwicy przebiegającej przez naskórek w głąb skóry, spowodowanej naniesieniem badanej substancji chemicznej na okres nieprzekraczający czterech godzin. Reakcjami na działanie żrące są wrzody, krwotoki, krwawiące strupy oraz – po zakończeniu 14-dniowej obserwacji – odbarwienia wynikłe ze zblednięcia skóry, obszary jednolitej alopecji, a także blizny. Celem oceny wątpliwych uszkodzeń można przeprowadzić badanie histopatologiczne.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (25).

Substancja: pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UPLC: ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

▼M8

Dodatek 2

GŁÓWNE SKŁADOWE MODELI BADANIA RHE ZATWIERDZONE DO BADAŃ DOTYCZĄCYCH DZIAŁANIA ŻRĄCEGO NA SKÓRĘ

Składowe modelu badania	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Powierzchnia modelu	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Liczba kontrprób tkanki	Co najmniej 2 na okres narażenia	2–3 na czas narażenia	Co najmniej 2 na okres narażenia	Co najmniej 2 na okres narażenia
Dawkowanie i stosowanie	Ciecze i substancje lepkie: 50 µl ±3 µl (131,6 µl/cm^2) Substancje stałe: 20 ±2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ±5µl roztworu NaCl (9 g/l) Substancje woskowate/kleiste: 50 ±2 mg (131,6 mg/cm^2) z siatką nylonową	Ciecze: 50 µl (79,4 µl/cm^2) z siatką nylonową lub bez *Kompatybilność badanej substancji chemicznej z siatką nylonową przed rozpoczęciem badania* Substancje półstałe: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Substancje stałe: 25 µl H_2O (lub więcej w razie potrzeby) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Substancje woskowate: płaski, podobny do krążka, kawałek o średnicy ok. 8 mm umieszczony na wierzchu tkanki zwilżonej 15 µl H_2O.	Ciecze i substancje lepkie: 40 µl ±3 µl (80 µl/cm^2) z siatką nylonową *Kompatybilność badanej substancji chemicznej z siatką nylonową przed rozpoczęciem badania* Substancje stałe: 20 µl ±2µl H_2O + 20 ±3 mg (40 mg/cm^2) Substancje woskowate/kleiste: 20 ±3 mg (40 mg/cm^2) z siatką nylonową	Ciecze: 50 µl (83,3 µl/cm^2) z siatką nylonową *Kompatybilność badanej substancji chemicznej z siatką nylonową przed rozpoczęciem badania* Substancje półstałe: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Substancje stałe: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (lub więcej w razie potrzeby) Substancja woskowata: płaski, podobny do ciastka, kawałek o średnicy ok. 8 mm umieszczony na wierzchu tkanki zwilżonej 15 µl H_2O.
Wstępna kontrola przed bezpośrednią redukcją MTT	50 µl (ciecz) lub 20 mg (substancja stała) + 2 ml MTT roztwór 0,3 mg/ml przez 180 ±5 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 % → jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać dostosowane kontrole martwych tkanek uśmiercanych wodą	50 µl (ciecz) lub 25 mg (substancja stała) + 1 ml MTT 1 mg/ml przez 60 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 % → jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać dostosowane kontrole uśmiercane przez zamrożenie	40 µl (ciecz) lub 20 mg (substancja stała) + 1 ml MTT roztwór 1 mg/ml przez 180 ±15 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO_2, 95 % RH → jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać dostosowane kontrole uśmiercane przez zamrożenie	50 µl (ciecz) lub 25 mg (substancja stała) + 1 ml MTT 1 mg/ml przez 60 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 % → jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać dostosowane kontrole uśmiercane przez zamrożenie

▼M8

Składowe modelu badania	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Wstępna kontrola zakłócenia barw	10 µl (cieczy) lub 10 mg (substancji stałej) + 90 µl H_2O mieszane przez 15 min w temperaturze pokojowej → jeżeli roztwór zabarwił się, należy wykonać żywe dostosowane kontrole	50 µl (cieczy) lub 25 mg (substancji stałej) + 300 µl H_2O przez 60 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 % → jeżeli roztwór zabarwił się, należy wykonać żywe dostosowane kontrole	40 µl (ciecz) lub 20 mg (substancja stała) + 300 µl H_2O mieszane przez 60 min w temperaturze pokojowej → jeżeli badana substancja chemiczna uległa zabarwieniu, należy wykonać żywe dostosowane kontrole	50 µl (cieczy) lub 25 mg (substancji stałej) + 300 µl H_2O przez 60 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 % → jeżeli roztwór zabarwił się, należy wykonać żywe dostosowane kontrole
Czas i temperatura narażenia	3 min, 60 min (±5 min) oraz 240 min (±10 min) W wentylowanej szafce Temperatura pokojowa (RT, 18–28 °C)	3 min w temperaturze pokojowej oraz 60 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 %	3 min w temperaturze pokojowej oraz 60 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 %	3 min w temperaturze pokojowej oraz 60 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 %
Płukanie	25 ml 1x PBS (2 ml/wrzucenie)	20 razy stałym, łagodnym strumieniem, wykorzystując 1x PBS	20 razy stałym, łagodnym strumieniem, wykorzystując 1x PBS	20 razy stałym, łagodnym strumieniem, wykorzystując 1x PBS
Kontrola ujemna	50 µl roztworu NaCl (9 g/l) Badana dla każdego okresu narażenia	50 µl H_2O Badana dla każdego okresu narażenia	40 µl H_2O Badana dla każdego okresu narażenia	50 µl H_2O Badana dla każdego okresu narażenia
Kontrola dodatnia	50 µl kwasu octowego lodowatego Badana tylko przez 4 godziny	50 µl 8N KOH Badana dla każdego okresu narażenia	40 µl 8N KOH Badana tylko przez 1 godzinę	50 µl 8N KOH Badana dla każdego okresu narażenia
Roztwór MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Czas i temperatura inkubacji z MTT	180 min (±15 min) w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 %	180 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 %	180 min (±15 min) w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 %	180 min w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej 95 %

▼M8

Składowe modelu badania	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Ekstrahent	500 µl zakwaszonego izopropanolu (0,04 N HCl w izopropanolu) (całkowicie zanurzona izolowana tkanka)	2 ml izopropanolu (ekstrakcja z dolnej i górnej części wkładki)	1,5 ml izopropanolu (ekstrakcja z dolnej i górnej części wkładki)	2 ml izopropanolu (ekstrakcja z dolnej i górnej części wkładki)
Czas trwania i temperatura ekstrakcji	Przez noc w temperaturze pokojowej, chronić przed światłem	Bez wstrząsania w temperaturze pokojowej przez noc lub ze wstrząsaniem w temperaturze pokojowej przez 120 min (~120 obr./min)	Bez wstrząsania w temperaturze pokojowej przez noc lub ze wstrząsaniem w temperaturze pokojowej przez 120 min (~120 obr./min)	Bez wstrząsania w temperaturze pokojowej przez noc lub ze wstrząsaniem w temperaturze pokojowej przez 120 min (~120 obr./min)
Odczyt OD	570 nm (545–595 nm) bez filtra referencyjnego	570 nm (lub 540 nm) bez filtra referencyjnego	570 nm (540–600 nm) bez filtra referencyjnego	540–570 nm bez filtra referencyjnego
Kontrola jakości tkanki	Poddawanie działaniu SDS przez 18 godzin 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Poddawanie działaniu 1 % Tritonu X-100 4,08 godz. ≤ ET_{50} ≤ 8,7 godz.	Poddawanie działaniu 1 % Tritonu X-100 4,0 godz. ≤ ET_{50} ≤ 10,0 godz.	Poddawanie działaniu 1 % Tritonu X-100 2,0 godz. ≤ ET_{50} ≤ 7,0 godz.
Kryteria dopuszczalności	1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej (NaCl) dla każdego okresu narażenia powinna być ≥ 0,6 i ≤ 1,5 2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 4 godziny z kontrolą dodatnią (kwas octowy lodowaty) wyrażona jako odsetek kontroli dodatnich powinna być ≤ 20 % 3. W zakresie żywotności 20–100 % oraz dla wartości OD ≥ 0,3 różnica między dwiema kontrpróbami tkanek nie powinna przekraczać 30 %	1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej (H_2O) dla każdego okresu narażenia powinna wynosić ≥ 0,8 i ≤ 2,8 2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 1 godzinę za pomocą kontroli dodatniej (8N KOH) wyrażona jako odsetek kontroli dodatnich powinna wynosić < 15 % 3. W zakresie żywotności 20–100 % współczynnik zmienności między kontrpróbami tkanek powinien wynosić ≤30 %	1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej (H_2O) dla każdego okresu narażenia powinna wynosić ≥ 0,8 i ≤ 3,0 2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 1 godzinę (a w stosownych przypadkach przez 4 godziny) za pomocą kontroli dodatniej (8N KOH) wyrażona jako odsetek kontroli dodatnich powinna wynosić < 15 % 3. W zakresie żywotności 20–100 % oraz dla wartości OD ≥ 0,3, różnica między dwiema kontrpróbami tkanek nie powinna przekraczać 30 %	1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej (H_2O) dla każdego okresu narażenia powinna wynosić ≥ 0,8 i ≤ 2,8 2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 1 godzinę za pomocą kontroli dodatniej (8N KOH) wyrażona jako odsetek kontroli dodatnich powinna wynosić < 20 % 3. W zakresie żywotności 20–100 % oraz dla wartości OD ≥ 0,3, różnica między dwiema kontrpróbami tkanek nie powinna przekraczać 30 %

▼**M8**

Dodatek 3

EFEKTYWNOŚĆ MODELI BADAŃ POD WZGLĘDEM SUBKATEGORYZACJI

Poniższa tabela przedstawia efektywność czterech modeli badań, którą obliczono na podstawie zestawu 80 substancji chemicznych badanych przez czterech producentów badań. Sekretariat OECD dokonał obliczeń, a podgrupa ekspertów przeprowadziła ich przegląd oraz je zatwierdziła (21) (23).

Modele badań EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ oraz epiCS® można dzielić na subkategorie (np. 1A a 1B oraz 1C a kontrola ujemna).

Efektywność, wskaźniki zawyżonej klasyfikacji, wskaźniki zaniżonej klasyfikacji oraz dokładność (zdolność predykcyjną) czterech modeli badań badano na podstawie zestawu 80 substancji chemicznych; wszystkie substancje badano w 2 lub 3 seriach badawczych dla każdego modelu badania:

STATYSTYKI DOTYCZĄCE PROGNOZ UZYSKANYCH W ODNIESIENIU DO CAŁEGO ZESTAWU SUBSTANCJI CHEMICZNYCH

(n = 80 substancji chemicznych badanych w 2 niezależnych seriach badawczych w odniesieniu do epiCS® lub na 3 niezależnych seriach badawczych w odniesieniu do EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ oraz SkinEthic™ RHE, np. odpowiednio 159 (*) lub 240 klasyfikacji)

	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Zawyżona klasyfikacja:				
1B i 1C zawyżona do 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
kontrola ujemna zawyżona do 1B i 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
kontrola ujemna zawyżona do 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
zawyżona klasyfikacja korekty	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Ogólny wskaźnik zawyżonej klasyfikacji (we wszystkich kategoriach)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Zaniżona klasyfikacja:				
1A zaniżona do 1B i 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A zaniżona do kontroli ujemnej	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B i 1C zaniżona do kontroli ujemnej	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Ogólny wskaźnik zaniżonej klasyfikacji (we wszystkich kategoriach)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Klasyfikacje poprawne:				
Poprawna klasyfikacja 1A	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
Poprawna klasyfikacja 1B i 1C	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Poprawna klasyfikacja kontroli ujemnej	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Ogólna dokładność	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NŻ: Substancja nieżrąca

(*) ze względu na brak dostępnosci, jedną substancję chemiczną jednokrotnie zbadano w epiCS® (23)

▼**M8**

Dodatek 4

Kluczowe parametry i kryteria dopuszczalności systemu spektrofotometrycznego HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT pobranego z tkanki RhE.

Parametr	Protokół wyprowadzony z Wytycznej FDA (37) (38)	Kryteria dopuszczalności
Selektywność	Analiza izopropanolu, ślepej próby z żywymi tkankami (izopropanolu pobranego z żyjących tkanek RhE niepoddanych działaniu jakichkolwiek substancji), ślepej próby z martwymi tkankami (izopropanolu pobranego z martwych tkanek RhE niepoddanych działaniu jakichkolwiek substancji)	$Obszar_{interferencja} \leq 20\ \%\ Obszar_{LLOQ}$ (1)
Precyzja	Kontrole jakości (tj. formazan MTT w stężeniu 1,6 µg/ml, 16 µg/ml oraz 160 µg/ml) w izopropanolu (n = 5)	CV ≤ 15 % lub ≤ 20 % w odniesieniu do LLOQ
Dokładność	Kontrole jakości w izopropanolu (n = 5)	% Dev ≤ 15 % lub ≤ 20 % w odniesieniu do LLOQ
Efekt matrycy	Kontrole jakości na żywej ślepej próbie (n = 5)	85 % ≤ efekt macierzysty % ≤ 115 %
Środek przeniesiony	Analiza izopropanolu według normy ULOQ (2)	$Obszar_{interferencja} \leq 20\ \%\ Obszar_{LLOQ}$
Odtwarzalność (śródzienna)	3 niezależne krzywe wzorcowe (na podstawie 6 kolejnych roztworów 1/3 formazanu MTT w izopropanolu, poczynając od ULOQ, np. 200 µg/ml); Kontrole jakości w izopropanolu (n = 5)	Krzywe kalibracyjne: % Dev ≤ 15 % lub ≤ 20 % w odniesieniu do LLOQ Kontrole jakości: % Dev ≤ 15 % oraz CV ≤ 15 %
Odtwarzalność (między kolejnymi dniami)	Dzień 1: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3) Dzień 2: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3) Dzień 3: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3)	
Krótkookresowa stabilność formazanu MTT w ekstrakcie tkankowym RhE	Kontrole jakości na żywej ślepej próbie (n = 3) analizowane w dniu przygotowania oraz po 24 godzinach składowania w temperaturze pokojowej	% Dev ≤ 15 %
W razie potrzeby – długookresowa stabilność formazanu MTT w ekstrakcie tkankowym RhE	Kontrole jakości w żywej ślepej próbie (n = 3) analizowane w dniu przygotowania oraz po kilku dniach przechowywania w określonej temperaturze (np. 4 °C, –20 °C, –80 °C)	% Dev ≤ 15 %

(1) LLOQ: Dolna granica oznaczalności określona tak, by obejmowała 1-2 % żywotności tkanek, tj. 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ: Górna granica oznaczalności określona tak, by była co najmniej dwukrotnie wyższa niż najwyższe oczekiwane stężenie formazanu MTT w ekstraktach izopropanolu z kontroli ujemnych 200 µg/ml.

▼B

B.41. **BADANIE FOTOTOKSYCZNOŚCI 3T3 NRU *IN VITRO***

1. METODA

Opisywana metoda testowa jest zgodna z OECD TG 432 (2004).

1.1. WSTĘP

Fototoksyczność definiuje się jako toksyczny wpływ substancji, na działanie której narażony jest organizm, przy czym wpływ ten jest spowodowany lub zwiększony (widoczny przy niskim poziomie dawki) przez ekspozycję na światło albo indukowany przez naświetlanie skóry po systematycznym podawaniu substancji.

Badanie *in vitro* fototoksyczności 3T3 NRU jest stosowany w celu określenia potencjału fototoksycznego substancji testowej, indukowanej przez związek chemiczny wzbudzony w wyniku ekspozycji na światło. Badanie służy do oceny fotocytotoksyczności, którą to ocenę przeprowadza się na podstawie względnego zmniejszenia się żywotności komórek narażonych na działanie substancji w świetle w porównaniu z ciemnością. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że substancje identyfikowane w tym teście po stosowaniu ogólnoustrojowym i nakładaniu na skórę lub po stosowaniu miejscowym są fototoksyczne in vivo.

Wiadome jest, że wiele rodzajów substancji chemicznych wywołuje efekt fototoksyczny (1)(2)(3)(4). Ich wspólną cechą jest zdolność do absorbowania energii światła w zakresie widma odpowiadającego widmu promieniowania słonecznego. Zgodnie z pierwszym prawem fotochemii (prawo Grotthausa-Drapera) fotoreakcja wymaga absorpcji dostatecznej liczby kwantów światła. Tak więc przed przeprowadzeniem testów biologicznych należy określić widmo absorbcyjne UV/vis substancji chemicznej według wytycznych OECD w zakresie badań 101. Stwierdzono, że jeśli molowy współczynnik ekstynkcji/absorpcji jest niższy niż 10 litrów xmo 1^{-1} × cm^{-1}, to jest mało prawdopodobne, że związek jest fotoreaktywny. Takiego związku nie trzeba poddawać badaniu fototoksycznemu in vitro 3T3 NRU ani innemu testowi biologicznemu na występowanie efektu fototoksycznego. Zob. także załącznik I.

Wiarygodność i znaczenie badania fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* zostały niedawno ocenione (6)(7)(8) (9). Wykazano, że badanie fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* dostarcza informacji o efektach ostrej fototoksyczności *in vivo* u zwierząt i ludzi. Badanie nie jest opracowany po to, aby przewidywać inne niekorzystne skutki, do których może dojść w wyniku połączonego działania substancji chemicznych i światła, np. nie znajduje zastosowania w przypadku fotogenotoksyczności, fotoalergii i fotokarcynogenności, nie umożliwia także oceny nasilenia fototoksyczności. Ponadto badanie nie jest przeznaczone do badania pośrednich mechanizmów fototoksyczności, działania metabolitów substancji testowej ani działania mieszanin.

Podczas gdy wykorzystanie reakcji metabolicznych jest ogólnym wymogiem przy ocenie poziomu genotoksyczności i karcynogenności dla wszystkich testów *in vitro*, w przypadku fototoksyczności jak dotąd znaleziono tylko nieliczne przykłady sytuacji, w których substancja zaczyna działać jako fototoksyna *in vivo* lub *in vitro* dopiero po przekształceniach metabolicznych. Tak więc obecnie nie uważa się ani za konieczne, ani za naukowo uzasadnione, aby test był przeprowadzany w połączeniu z systemem aktywacji metabolicznej.

▼B

1.2. DEFINICJE

Irradiancja: intensywność światła ultrafioletowego (UV) lub widzialnego padającego na powierzchnię w W/m^2 lub W/cm^2.

Dawka światła: ilość (= natężenie × czas) promieniowania ultrafioletowego (UV) lub widzialnego padającego na powierzchnię, wyrażona w dżulach (= W × s) na powierzchnię, np. J/m^2 lub J/cm^2.

Zakresy długości fal UV: CIE (Międzynarodowa Komisja Oświetleniowa) zaleca następujące oznaczenia: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) i UVC (100–280 nm). Inne oznaczenia również mogą być stosowane; podział między UVB a UVA jest często przeprowadzany przy 320 nm, a UVA mogą być dzielone na UV-A1 i UV-A2, z granicą przy około 340 nm.

Żywotność komórek: parametr określający całkowitą aktywność populacji komórek (np. wychwyt barwnika przeżyciowego Natural Red do lizosomów komórki) który, w zależności od pomiaru końcowego i zastosowanego schematu badania, koreluje z całkowitą liczbą i/lub żywotnością komórek.

Względna żywotność komórek: żywotność komórek wyrażona w stosunku do kontroli rozpuszczalnikowych (negatywnych), których próbki były pobierane przez całą procedurę testową (+Irr lub -Irr), ale które nie były poddawane działaniu substancji testowej.

PIF (Photo Irritation Factor – współczynnik fotopodrażnienia): współczynnik uzyskany przez porównanie dwóch tak samo efektywnych stężeń cytotoksycznych (IC50) testowanej substancji, otrzymany przy braku (-Irr) i przy zastosowaniu (+Irr) niecytotoksycznej irradiacji UVA/vis.

IC50: stężenie testowanej substancji, przy której żywotność komórek jest zmniejszona o 50 %.

MPE (Mean Photo Effect – średni fotoefekt): miara uzyskana z matematycznej analizy krzywych odpowiedzi na stężenie, otrzymana przy braku (-Irr) i przy zastosowaniu (+Irr) niecytotoksycznej irradiacji UVA/vis.

Fototoksyczność: reakcja na toksyczność ostrą, pojawiająca się po pierwszej ekspozycji skóry na niektóre substancje chemiczne, a następnie ekspozycji na światło lub reakcja, która jest wywołana przez naświetlanie skóry po systematycznym, ogólnoustrojowym podawaniu substancji.

1.3. ZASADA METODY BADANIA

Badanie fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* polega na porównaniu cytotoksyczności substancji przy zastosowaniu i przy braku ekspozycji na niecytotoksyczną dawkę symulowanego światła słonecznego. Cytotoksyczność w tym teście jest wyrażona jako zależne od stężenia zmniejszanie wychwytu barwnika przyżyciowego Neutral Red, mierzone 24 godziny po wprowadzeniu substancji chemicznej i irradiacji (10). NR jest słabym barwnikiem kationowym, który łatwo przenika niedyfuzyjnie przez błony komórkowe i zbiera się wewnątrz komórek, w lizosomach. Modyfikacje powierzchni delikatnej błony lizosomów powodują kruchość lizosomów i inne zmiany, które stopniowo stają się nieodwracalne. Zmiany takie, wywołane przez działanie ksenobiotyków, prowadzą do zmniejszonego wychwytu i wiązania NR. Można więc wyróżnić w pełni żywotne, uszkodzone i martwe komórki, co stanowi podstawę testu.

▼B

Komórki Balb/c 3T3 hoduje się przez 24 godziny w celu wytworzenia monowarstw. Dwie płytki z 96 studzienkami na substancję testową są przez 1 godz. wstępnie inkubowane z substancją testową w ośmiu różnych stężeniach. Następnie jedna z dwóch płytek jest poddawana działaniu najwyższej niecytotoksycznej dawce irradiacji, podczas gdy druga płytka trzymana jest w ciemności. Na obu płytkach pożywka jest badana następnie wymieniana na pożywkę kontrolną i po następnych 24 godzinach inkubacji określa się żywotność komórek na podstawie wychwytu barwnika Neutral Red. Żywotność komórek wyrażana jest jako procent nie poddawanych działaniu substancji kontroli rozpuszczalnikowych i jest określana dla każdego stężenia testowego. W celu określenia potencjału fototoksycznego porównuje się odpowiedzi na zmienne stężenia w obecności i przy braku irradiacji, zwykle na poziomie IC50, tj. przy stężeniu zmniejszającym żywotność do 50 % w stosunku do kontroli nie poddawanej działaniu irradiacji.

1.4. OPIS METODY BADANIA

1.4.1. **Przygotowania**

1.4.1.1. *Komórki*

W badaniu walidacyjnym użyta została ustalona linia fibroplastów mysich Balb/c 3T3, klon 31, z hodowli amerykańskiej American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, albo z hodowli europejskiej European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK i wobec tego zaleca się, aby pobierać materiał z odpowiednich banków komórek. Inne komórki lub linie komórek mogą być użyte do tej samej procedury testowej jeśli warunki hodowli są dostosowane do specyficznych potrzeb komórek, ale należy wykazać równoważność warunków.

Komórki powinny być regularnie sprawdzane pod kątem braku skażenia mykoplazmami i używane tylko, jeśli stwierdzono całkowity ich brak (11).

Ważne jest, aby regularnie sprawdzać wrażliwość komórek na UV, zgodnie z procedurą kontroli jakości przedstawioną w opisie metody. Ponieważ wrażliwość komórek na UVA może wzrastać wraz z liczbą pasaży, należy użyć komórek Balb/c 3T3 o możliwie jak najmniejszej liczbie pasaży, najlepiej poniżej stu. (Zob. część 1.4.2.2.2. i załącznik 2).

1.4.1.2. *Pożywki i warunki hodowli kultury*

Przy rutynowych pasażach komórek oraz w trakcie procedury testowej należy przestrzegać odpowiednich warunków inkubacji i stosować odpowiednie pożywki hodowlane, np. w przypadku komórek Balb/c 3T3 powinna to być pożywka DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), z dodatkiem 10 % surowicy nowo urodzonych cieląt, 4 mM glutaminy, penicyliny (100IU), streptomycyny (100 µg/mL), inkubowana w wilgotnych warunkach w 37 C, 5–7,5 % CO_2 w zależności od bufora (zob.część 1.4.1.4 akapit drugi). Szczególne znaczenie ma, aby warunki hodowli komórek zapewniały cykl komórek, którego okres trwania odpowiada wcześniejszym cyklom używanych komórek lub linii komórek.

1.4.1.3. *Przygotowanie kultur*

Komórki z zamrożonych kultur macierzystych są wysiewane do pożywki hodowlanej przy odpowiednim zagęszczeniu i następnie – zanim zostaną użyte w teście fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* – przynajmniej raz wysiane na hodowle wtórne.

▼B

Komórki używane do badania fototoksyczności są wysiewane do pożywki hodowlanej w odpowiednim zagęszczeniu, tak żeby nie dochodziło do przegęszczenia przed końcem badania, to znaczy do momentu, kiedy po 48 godzinach od wysiewania komórek oceniana jest ich żywotność. W przypadku komórek Balb/c 3T3 hodowanych na 96-studzienkowych płytkach zalecane zagęszczenie wynosi 1×10^4 komórek na studzienkę.

W przypadku każdej substancji testowej komórki są wysiewane w taki sam sposób na dwie 96-studzienkowe płytki, poddawane równocześnie całej procedurze testowej w identycznych warunkach hodowli – z wyjątkiem okresu, w którym jedna z płytek jest naświetlana (+Irr), a druga trzymana w ciemności (-Irr).

1.4.1.4. *Przygotowanie substancji testowej*

Substancje testowe muszą być przygotowywane na świeżo, bezpośrednio przed użyciem, chyba że istniejące dane wskazują na ich stabilność w czasie przechowywania. Zaleca się, aby wszelkie operacje z substancjami chemicznymi i wstępna obróbka komórek były wykonywane w warunkach świetlnych, które nie spowodują fotoaktywacji lub rozkładu substancji testowej przed irradiacją.

Substancje chemiczne powinny być rozpuszczane w buforowanych roztworach soli, np. w zrównoważonym roztworze soli Earla (EBSS) lub innych fizjologicznie zrównoważonych roztworach, które nie mogą zawierać składników białkowych, składników absorbujących światło (np. barwnych wskaźników pH i witamin), aby w czasie irradiacji nie dochodziło do interferencji. Ponieważ w czasie irradiacji komórki są trzymane przez około 50 minut poza inkubatorem CO_2, należy uważać, aby nie doszło do alkalizacji. Jeśli stosowane są słabe bufory takie jak EBSS, można to osiągnąć przez inkubację komórek w obecności 7,5 % CO_2. Jeśli komórki są inkubowane w obecności jedynie 5 % CO_2, należy wybrać silniejszy bufor.

Substancje testowe o ograniczonej rozpuszczalności w wodzie powinny być rozpuszczane w odpowiednim rozpuszczalniku. Jeśli stosowany jest rozpuszczalnik, we wszystkich hodowlach musi on występować w tym samym stężeniu, tj. zarówno w kontrolach negatywnych (rozpuszczalnikowych), jak i we wszystkich stężeniach substancji testowej i nie może być przy tym stężeniu toksyczny. Stężenia substancji chemicznej należy dobierać tak, aby nie dopuścić do wytrącania się lub zmętnienia roztworów.

Zalecanymi rozpuszczalnikami są sulfotlenek dimetylu (DMSO) i etanol (ETOH). Można również użyć innych rozpuszczalników o niskiej cytotoksyczności. Przed użyciem wszystkie rozpuszczalniki powinny być ocenione pod kątem określonych właściwości, np. reakcji z substancją testową, tłumienia efektu fototoksycznego, właściwości zmiatania wolnych rodników i/lub stabilności chemicznej w rozpuszczalniku.

Jeśli nie ma to wpływu na stabilność substancji testowej można ułatwić rozpuszczanie stosując mieszanie wirowe i/lub podgrzewanie do odpowiedniej temperatury.

▼B

1.4.1.5. *Warunki irradiacji*

1.4.1.5.1. Źródło światła

W badaniach fototoksyczności wybór odpowiedniego źródła światła ma podstawowe znaczenie. Światło UVA i w widzialnych częściach widma wiąże się zwykle z fototoksycznymi reakcjami *in vivo* (3)(12), natomiast UVB ma z nimi mniejszy związek, ale jest wysoce cytotoksyczny; cytotoksyczność wzrasta tysiąckrotnie kiedy długość fali zmienia się z 313 do 280 nm (13). Kryteria wyboru odpowiedniego źródła światła muszą obejmować wymóg, aby źródło światła emitowało długości fal absorbowanych przez substancję testową (widmo absorpcyjne) i żeby dawka światła (osiągalna w rozsądnym czasie ekspozycji) wystarczała do wykrycia znanych substancji fotocytotoksycznych. Co więcej, zastosowane długości fal i dawki nie powinny być zbytnio szkodliwe dla systemu testowego, np. emisja ciepła (promieniowanie podczerwone).

Uważa się, że optymalnym rodzajem światła jest światło pochodzące z symulatorów światła słonecznego. Rozkład mocy irradiacji symulatora światła słonecznego wyposażonego w filtry powinien być zbliżony do widma światła dziennego podanego w (14). Jako symulatory światła słonecznego używane są zarówno łukowe lampy ksenonowe, jak i lampy (domieszkowane) rtęciowo-metalowo-halogenkowe (15). Te ostatnie mają tę zaletę, że emitują mniej ciepła i są tańsze, ale mniej doskonale niż lampy ksenonowe imitują światło słoneczne. Ponieważ wszystkie symulatory światła słonecznego emitują znaczne ilości UVB, powinny być wyposażone w odpowiednie filtry, aby zredukować wysoce toksyczne promieniowanie UVB. Ponieważ plastikowe materiały stosowane przy hodowlach komórek zawierają stabilizatory UV, widmo powinno być mierzone przez ten sam typ pokrywy płytki z 96 studzienkami, jaki jest używany w teście. Niezależnie od kroków podjętych w celu osłabienia promieniowania w niektórych częściach widma przez filtrowanie lub na skutek nieuniknionego oddziaływania sprzętu, widmo rejestrowane poniżej tych filtrów nie powinno odbiegać od widma standardowego światła dziennego (14). Przykład rozkładu widma irradiancji wyposażonego w filtry symulatora światła słonecznego stosowanego w badaniu walidacyjnym badania fotoksyczności 3T3 NRU *in vitro* podano w (8)(16). Zob. także załącznik 2 rysunek 1.

1.4.1.5.2 Dozymetria

Intensywność światła (irradiancja) powinna być regularnie sprawdzana przy użyciu odpowiedniego, szerokopasmowego miernika UV przed każdym badaniem fototoksyczności. Intensywność powinna być mierzona przez tego samego typu pokrywę płytki z 96 studzienkami co stosowana w badaniu. Miernik UV musi być wykalibrowany stosownie do źródła. Należy sprawdzać sprawność miernika UV i w tym celu używać drugiego, wzorcowego licznika UV tego samego typu, zalecana jest identyczna kalibracja. W idealnym przypadku, w większych odstępach czasu, do pomiaru irradiancji spektralnej filtrowanego źródła światła i do sprawdzania szerokopasmowego miernika UV powinien być używany spektroradiometr.

Stwierdzono, że dawka 5 J/cm^2 (mierzona w zakresie UVA) nie jest toksyczna dla komórek Balb/c 3T3 i jest wystarczająco silna, aby wzbudzić substancje chemiczne i spowodować ich wejście w reakcje fotoksyczne (6)(17), np. żeby uzyskać 5 J/cm^2 w ciągu 50 minut irradiancja została ustalona na 1,7 mW/cm^2. Zob. załacznik 2, rysunek 2. Jeśli używa się innej linii komórek albo innego źródła światła, może być konieczne przeprowadzenie kalibracji dawki irradiacji, tak aby został dobrany schemat dawek, który nie jest szkodliwy dla komórek, a zarazem jest wystarczający, aby spowodować wzbudzenie standardowych fototoksyn. Czas ekspozycji na światło wyliczany jest w następujący sposób:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dawka irradiacji}(J/cm^2) \times 1000}{\text{irradiacja}\ (mW/cm^2) \times 60} \quad 1\ \text{J} = 1\ \text{W sec}$$

1.4.2. **Warunki badania**

1.4.2.1. *Stężenia substancji testowej*

Zakresy stężeń substancji chemicznej testowanej przy naświetleniu (+Irr) i bez światła (-Irr) powinny być odpowiednio określone w eksperymentach służących wyznaczeniu zakresów dawki. Przydatne może być przeprowadzenie początkowej oceny rozpuszczalności, a następnie po 60 minutach (lub jakimkolwiek innym czasie, odpowiednim do schematu badania), jako że rozpuszczalność może znacznie się zmieniać w czasie lub w trakcie ekspozycji. Aby uniknąć toksyczności, spowodowanej niewłaściwymi warunkami hodowli lub obecnością silnie kwaśnych lub zasadowych związków chemicznych, po dodaniu badanej substancji pH hodowli komórkowych powinno mieścić się w przedziale 6,5–7,8.

Najwyższe stężenie substancji testowej powinno mieścić się w granicach fizjologicznych, tzn. należy unikać stresu pH i osmotycznego. W zależności od substancji testowej może być konieczne wzięcie pod uwagę innych właściwości fizyko-chemicznych jako czynników ograniczających najwyższe stężenie testowe. W przypadku stosunkowo trudno rozpuszczalnych substancji, które nie są toksyczne przy stężeniach do punktu nasycenia, należy testować najwyższe możliwe do osiągnięcia stężenie. Generalnie, należy unikać wytrącania substancji testowej przy jakimkolwiek stężeniu testowym. Maksymalne stężenie substancji testowej nie powinno przekraczać 1 000 g/mL; osmolarność nie powinna przekraczać 10 mmol. Należy użyć 8 stężeń substancji testowej przygotowanych zgodnie z postępem geometrycznym, ze stałym współczynnikiem rozcieńczania (zob. część 2.1 akapit drugi).

Jeśli istnieją dane wskazujące (uzyskane w toku eksperymentu określającego zakres), że substancja testowa nie jest cytotoksyczna do stężenia granicznego w eksperymencie ciemnym (-Irr), ale jest wysoce cytotoksyczna w przypadku naświetlania (+Irr), zakresy stężeń wybranych dla eksperymentu (+Irr) mogą się różnić od zakresu stężeń dla (-Irr), jeśli eksperyment ma spełnić wymaganie odpowiedniej jakości danych.

1.4.2.2. *Kontrole*

1.4.2.2.1. Wrażliwość komórek na promieniowanie, ustalanie danych historycznych

Komórki powinny być regularnie sprawdzane (mniej więcej co piąty pasaż) pod kątem wrażliwości na źródło światła przez ocenę ich żywotności po ekspozycji na rosnące dawki światła. W ocenie należy zastosować kilka dawek irradiacji, w tym dawki, które są znacznie większe od dawek użytych w badaniu fototoksyczności 3T3 NRU. Dawki te najłatwiej skwantyfikować mierząc cześć UV widma emitowanego przez źródło światła. Komórki są wysiewane przy gęstości stosowanej w badaniu fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* i naświetlane następnego dnia. Następnie, na podstawie wychwytu barwnika Neutral Red, określana jest żywotność komórek. Należy wykazać, że ostateczna najwyższa dawka nietoksyczna (np. w badaniu walidacyjnym: 5 J/cm^2 [UVA]) była wystarczająca do prawidłowego sklasyfikowania wzorcowych substancji chemicznych (tabela 1).

▼B

1.4.2.2.2. Wrażliwość na promieniowanie, sprawdzenie bieżącego badania:

TBadanie spełnia kryteria jakościowe, jeśli naświetlone kontrole negatywne/rozpuszczalnikowe wykazują żywotność ponad 80 % w porównaniu z nie naświetlaną kontrolą negatywną/rozpuszczalnikową.

1.4.2.2.3 Żywotność kontroli rozpuszczalnikowych:

Absolutna gęstość optyczna ($OD_{540\ NRU}$) barwnika Neutral Red wyekstrahowanego z kontroli rozpuszczalnikowych wskazuje, czy 1 × 104 komórek wysianych do każdej studzienki w ciągu dwóch dni testu mnożyło się, podwajając liczebność w normalnym czasie. Badanie spełnia kryteria akceptacji, jeśli średnia $OD_{540\ NRU}$ kontroli nie poddanych działaniu substancji wynosi > 0,4 (tj. około dwadzieścia razy więcej niż absorbancja rozpuszczalnika w tle).

1.4.2.2.4. Kontrola pozytywna:

Równocześnie z każdym badaniem *in vitro* fototoksyczności 3T3 NRU powinna być testowana znana substancja fototoksyczna. Zaleca się chlorpromazynę (CPZ). W przypadku CPZ testowanej zgodnie ze standardową procedurą, w teście fotoksyczności 3T3 NRU *in vitro*, określono następujące kryteria akceptacji: CPZ naświetlona (+Irr): IC_{50} = 0,1 do 2,0 µg/ml, CPZ nienaświetlona (-Irr): IC_{50} = 7,0 do 90,0 µg/mL. Współczynnik fotopodrażnienia (PIF) powinien być > 6. Należy monitorować zmiany w czasie parametrów kontroli pozytywnej.

Zamiast chloropromazyny do równoczesnych kontroli pozytywnych można użyć związków fototoksycznych, odpowiednich dla klasy chemicznej lub charakterystyki rozpuszczalności ocenianego związku chemicznego.

1.4.3 **Procedura badania (6)(7)(8)(16)(17):**

1.4.3.1 *Pierwszy dzień:*

Rozmieścić 100 µL pożywki hodowlanej w peryferyjnych studzienkach 96-studzienkowej płytki mikrotitracyjnej do hodowli tkankowych (= puste). W pozostałych studzienkach rozmieścić 100 µL zawiesiny komórek (l × 10^5 komórek/mL) w pożywce hodowlanej (= 1 × 10^4 komórek/studzienka). Dla każdej serii stężeń danej substancji testowej oraz dla kontroli rozpuszczalnikowej i kontroli dodatniej należy przygotować dwie płytki.

Inkubować komórki przez 24 godziny (zob. część 1.4.1.2), dopóki nie utworzą na wpół jednolitej monowarstwy. Okres inkubacji umożliwia komórkom odzyskanie żywotności, przyleganie i wzrost wykładniczy.

1.4.3.2 *Drugi dzień:*

Po inkubacji zdekantować pożywkę hodowlaną z komórek i przemyć je ostrożnie 150 µL roztworu buforowego użytego do inkubacji. Dodać 100 µL buforu zawierającego odpowiednie stężenie substancji testowej lub rozpuszczalnika (kontrola rozpuszczalnikowa). Zastosować 8 różnych stężeń substancji testowej. Inkubować komórki z substancją testową w ciemności przez 60 minut (zob. część 1.4.1.2 i 1.4.1.4 akapit drugi).

Z dwóch płytek przygotowanych do każdej serii stężeń substancji testowej i kontroli wybiera się jedną, zwykle losowo, do oznaczenia cytotoksyczności (-Irr) (tj. płytka kontrolna) i jedną (płytka eksperymentalna) do oznaczenia fototoksyczności (+Irr).

▼B

W celu przeprowadzenia ekspozycji +Irr naświetlać komórki w temperaturze pokojowej przez 50 minut przez pokrywę 96-studzienkowej płytki przy najwyższej dawce promieniowania, które nie jest toksyczne (zob. także załącznik 2). Trzymać nienaświetlone płytki (-Irr) w temperaturze pokojowej w ciemności (= czas ekspozycji na światło).

Zdekantować roztwór testowy i ostrożnie przemyć dwukrotnie 150 µL buforowanym roztworem używanym do inkubacji, ale nie zawierającym materiału testowego. Zamienić bufor na pożywkę hodowlaną i inkubować (zob. część 1.4.1.2) do następnego dnia (godz. 18–22).

1.4.3.3 *Trzeci dzień:*

1.4.3.3.1 Ocena mikroskopowa

Komórki powinny być sprawdzone pod kątem wzrostu, morfologii oraz kompletności monowarstwy za pomocą kontrastowego mikroskopu fazowego. Należy zanotować zmiany w morfologii komórek i wpływ na wzrost komórek.

1.4.3.3.2 Badanie wychwytu barwnika Neutral Red

Przemyć komórki 150 µL podgrzanego buforu. Usunąć roztwór do przemywania poprzez lekkie stukanie. Dodać 100 µL nośnika, zawierającego 50 µg/mL barwnika Neutral Red (NR) (chlorowodorek 3-amino-7-dimetyloamino-2-metylofenazyny, numer EINECS 209-035-8; numer CAS 553-24-2; C.I. 50040) oraz surowicę (16) i przez 3 godz. inkubować jak opisano w akapicie 1.4.1.2. Po inkubacji usunąć nośnik zawierający NR i przemyć komórki 150 µL buforu. Zdekantować i usunąć nadmiar buforu przez odsączenie lub odwirowanie.

Dodać dokładnie 150 µL roztworu desorbującego NR (świeżo przygotowanego, 49 części wody + 50 części etanolu + 1 część kwasu octowego).

Wytrząsać delikatnie płytkę do mikromiareczkowania w wytrząsarce do płytek przez 10 minut, dopóki NR nie zostanie wyekstrahowany z komórek i nie utworzy jednorodnego roztworu.

Zmierzyć gęstość optyczną ekstraktu NR w spektrofotometrze przy 540 nm, stosując próby puste jako odniesienie. Zapisać dane w elektronicznym pliku w odpowiednim formacie w celu dalszej analizy.

2. DANE

2.1. JAKOŚĆ I ILOŚĆ DANYCH

Dane testowe powinny umożliwić wiarygodną analizę odpowiedzi na stężenia, otrzymanych w obecności i przy braku irradiacji i – jeśli to możliwe – stężenia testowanej substancji, przy którym żywotność komórek jest zredukowana do 50 % (IC_{50}). Jeśli stwierdzona została cytotoksyczność, zarówno zakres stężenia, jak i punkty przecięcia z osią krzywych dla poszczególnych stężeń powinny być ustalone w taki sposób, aby umożliwić dopasowanie krzywej do danych eksperymentalnych.

Zarówno w przypadku wyraźnie dodatnich, jak i wyraźnie ujemnych wyników (zob. część 2.3 akapit pierwszy) może wystarczyć pierwotny eksperyment, poparty jednym lub kilku wstępnymi testami określającymi zakres.

▼B

Wyniki niejednoznaczne, bliskie wartości granicznych lub niejasne powinny zostać przed dalszym testowaniem wyjaśnione (zob. także część 2.4 akapit drugi). W takim przypadku należy rozważyć modyfikację warunków eksperymentu. Do wyników eksperymentalnych, które mogą być modyfikowane, zalicza się zakres stężeń lub różnice między kolejnymi stężeniami, czas wstępnej inkubacji oraz czas ekspozycji na irradiację. W przypadku substancji, które łatwo hydrolizują może być właściwe zastosowanie krótszego czasu ekspozycji.

2.2. OCENA WYNIKÓW

Aby umożliwić ocenę danych można obliczyć współczynnik fotopodrażnienia (PIF) lub średni efekt fotoelektryczny.

Przy obliczaniu miar fotoksyczności (zob. niżej) należy wyznaczyć za pomocą odpowiedniej ciągłej krzywej odpowiedzi na stężenie (model) grupę dyskretnych wartości odpowiedzi na stężenie. Dopasowywanie krzywej do danych zwykle odbywa się za pomocą metody regresji nieliniowej (18). Aby ocenić wpływ zmienności danych na kształt dopasowanej krzywej, zaleca się zastosować metodę bootstrap.

Współczynnik fotopodrażnienia (PIF) jest obliczany według następującego wzoru:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Jeśli nie da się obliczyć IC50 w obecności lub przy braku światła, nie jest możliwe obliczenie PIF dla materiału testowego. Średni efekt fotoelektryczny (MPE) wyznacza się na podstawie porównania całych krzywych odpowiedzi na stężenie (19). Efekt ten definiowany jest jako średnia ważona reprezentatywnego zbioru wartości efektu fotoelektrycznego

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Efekt fotoelektryczny PEc przy dowolnym stężeniu C jest definiowany jako iloczyn efektu odpowiedzi REc i efektu dawki DEc, tj. PEc = REc × DEc. Efekt odpowiedzi REc jest różnicą między odpowiedziami obserwowanymi przy braku światła i przy świetle, tj. REc = REc = Rc (-Irr) – Rc (+Irr). Efekt dawki oblicza się według wzoru:

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

gdzie C* oznacza stężenie równoważne, tj. stężenie, przy którym odpowiedź +Irr jest taka sama jak odpowiedź -Irr przy stężeniu C. Jeśli C* nie da się określić ponieważ wartości odpowiedzi na krzywej + Irr są systematycznie wyższe lub niższe niż RC (-Irr), efekt dawki jest przyjmowany za 1. Czynniki ważące są wyznaczone przez najwyższą wartość odpowiedzi, tj. Wi = MAX { R_i (+Irr), Ri (-Irr)}. Tabela stężeń C_i jest dobierana w taki sposób, że ta sama liczba punktów przypada na każdy z przedziałów stężenia, określonych przez wartości stężenia zastosowane w eksperymencie. Obliczanie MPE ogranicza się do maksymalnej wartości stężenia, przy której co najmniej jedna z dwóch krzywych wciąż wykazuje wartość odpowiedzi co najmniej 10 %. Jeśli to maksymalne stężenie jest wyższe niż najwyższe stężenie zastosowane w eksperymencie +Irr, pozostała część krzywej +Irr jest dopasowywana do wartości odpowiedzi „0”. Substancja jest klasyfikowana jako fototoksyczna, w zależności od tego, czy wartość MPE jest większa niż odpowiednio wybrany punkt odcięcia (MPEc = 0,15), czy nie.

▼B

Pakiet programów do obliczania PIF i MPE można uzyskać na stronie internetowej OECD (20).

2.3. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Na podstawie badań walidacyjnych (8) substancja testowa z PIF < 2 lub MPE <0,1 oznacza: „brak fototoksyczności". PIF > 2 i < 5 lub MPE > 0,1 i < 0,15 oznacza: „prawdopodobną fototoksyczność"; a PIF > 5 lub MPE > 0,15 oznacza: „fototoksyczność".

W każdym laboratorium zaczynającym przeprowadzać to badanie, przed przebadaniem substancji testowej pod kątem fototoksyczności należy poddać testom materiały wzorcowe wymienione w tabeli 1. Wartości PIF lub MPE powinny być bliskie wartości wymienionych w tabeli 1.

Tabela 1

Nazwa chemiczna	Nr EINECS	Nr CAS	PIF	MPE	Pik absorpcji	Rozpuszczalnik (1)
Amiodaron HCL	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27–0,54	242 nm 300 nm (prog)	etanol
Chloropromazyna HCL	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33–0,63	309 nm	etanol
Norfloksacyna	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34–0,90	316 nm	acetonitryle
Antracen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19–0,81	356 nm	acetonitryle
Protoporfiryna IX, Disodium	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54–0,74	402 nm	etanol
L-Histydyna		[7006-35-1]	brak PIF	0,05–0,10	211 nm	woda
Heksachlorofen	200-733-8	[70-30-4]	1,1—1,7	0,00–0,05	299 nm 317nm (prog)	etanol
Siarczan sodowy laurylu	205-788-1	[151-21-3]	1,0—1,9	0,00–0,05	brak absorpcji	woda

(1) Rozpuszczalnik używany do mierzenia absorpcji.

2.4. INTERPRETACJA DANYCH

Jeśli efekty fototoksyczne występują jedynie przy najwyższych stężeniach testowych (zwłaszcza w przypadku substancji testowych rozpuszczalnych w wodzie), ocena zagrożenia może wymagać uwzględnienia innych czynników. Mogą to być dane o wchłanianiu przez skórę i akumulacji substancji w skórze i/lub dane pochodzące z innych badań, np. badań *in vitro* na skórze ludzkiej lub zwierzęcej lub na modelach skóry.

▼B

Jeśli wykazano brak fototoksyczności (+Irr i -Irr) i jeśli słaba rozpuszczalność ograniczała wartość stężenia, jakie mogło być poddane testom, to kompatybilność substancji testowej z testem może być kwestionowana. Należy wtedy przeprowadzić testy potwierdzające przy użyciu np. innego modelu.

3. SPRAWOZDAWCZOŚĆ

SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z przeprowadzonego badania musi zawierać co najmniej następujące informacje:

Substancja testowa:

— dane identyfikacyjne, powszechnie stosowaną nazwę ogólną oraz numer IUPAC i CAS, jeśli są znane,

— stan skupienia i czystość,

— właściwości fizykochemiczne związane z tokiem badań,

— widmo absorpcyjne UV/vis,

— stabilność i fotostabilność, jeśli są znane.

Rozpuszczalnik:

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika,

— rozpuszczalność substancji testowej w rozpuszczalniku,

— procent rozpuszczalnika obecnego w pożywce testowej.

Komórki:

— typ i źródło komórek,

— brak mykoplazm,

— liczba pasaży komórek, jeśli znana.

— Wrażliwość komórek na promieniowanie, określona za pomocą sprzętu irradiacyjnego stosowanego w teście fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro*.

Warunki badania (1); *inkubacja przed i po procedurze*:

— typ i skład pożywki hodowlanej,

— warunki inkubacji (stężenie CO_2; temperatura; wilgotność),

— czas trwania inkubacj i (przed procedurą testową, po procedurze testowej).

Warunki testu (2); *poddawanie działaniu substancji chemicznej*:

— uzasadnienie wyboru stężeń substancji testowej stosowanych przy naświetlaniu i bez naświetlania,

— w przypadku ograniczonej rozpuszczalności substancji testowej i braku cytotoksyczności: uzasadnienie dla najwyższego testowanego stężenia,

— typ i skład pożywki testowej (buforowany roztwór soli),

— czas działania substancji chemicznej.

Warunki testu (3); *irradiacja:*

— uzasadnienie wyboru stosowanego źródła światła,

▼B

— producent i typ źródła światła i radiometru,

— charakterystyka widmowa irradiancji źródła światła,

— charakterystyka przepuszczalności i absorpcji stosowanego(-ych) filtra(-ów),

— charakterystyka radiometru i szczegóły jego kalibracji,

— odległość źródła światła od systemu testowego,

— irradiancja UVA przy tej odległości wyrażona w mW/cm^2,

— czas trwania ekspozycji na światło UV/vis,

— dawka UVA (irradiancja x czas), wyrażona w J/cm^2,

— temperatura hodowli komórkowych w czasie naświetlania i równoczesnych hodowli komórkowych trzymanych w ciemności.

Warunki testu (4); *test żywotności Neutral Red*:

— skład pożywki testowej Neutral Red,

— czas trwania inkubacji Neutral Red,

— warunki inkubacji (stężenie CO_2, temperatura, wilgotność),

— Warunki ekstrakcji Neutral Red (rozpuszczalnik do ekstrakcji, czas trwania),

— długość fali użytej do spektrofotometrycznego odczytu gęstości optycznej Neutral Red,

— druga długość fali (wzorcowa), jeśli stosowano,

— zawartość próby ślepej spektrofotometru, jeśli używano.

Wyniki:

— żywotność komórek otrzymywana przy każdym stężeniu substancji testowej, wyrażona w procentach żywotności średnich, równoczesnych kontroli rozpuszczalnikowych;

— krzywe odpowiedzi na stężenie (stężenie substancji testowej w stosunku do względnej żywotności komórek) uzyskane w równoczesnych eksperymentach +Irr i -Irr;

— analiza krzywych odpowiedzi na stężenie: jeśli to możliwe, obliczenie IC_{50} (+Irr) i IC_{50} (-Irr);

— porównanie dwóch krzywych odpowiedzi na stężenie otrzymanych w obecności i przy braku irradiacji, albo przez obliczenie współczynnika fotopodrażnienia (PIF) lub średniego fotoefektu (MPE);

— kryteria akceptacji testu; równoczesna kontrola rozpuszczalnikowa:

— żywotność absolutna (gęstość optyczna ekstraktu Neutral Red) komórek naświetlanych i nienaświetlanych,

— historyczne dane dotyczące kontroli negatywnej i rozpuszczalnikowej; średnie i standardowe odchylenia,

— kryteria akceptacji testu; równoczesna kontrola pozytywna,

▼B

— IC_{50} (+Irr) i IC_{50} (-Irr) oraz PIF/MPE substancji kontroli pozytywnej,

— historyczne dane dotyczące substancji kontroli pozytywnej: IC_{50} (+Irr) i IC_{50} (-Irr) oraz PIF/MPE; średnie i standardowe odchylenia.

Dyskusja o wynikach.

Wnioski.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 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). The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314–348.

(4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In „The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 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., Dóring, B., Holzhutter, 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, 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, 26,7–8.

(8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhutter, 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. Toxic. In Vitro 12, 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., 24,119–124.

(11) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 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, p 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, 1825–1829.

(14) (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 3900734275

(16) ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

(17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhutter, 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, 679-708.

(18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127–138.

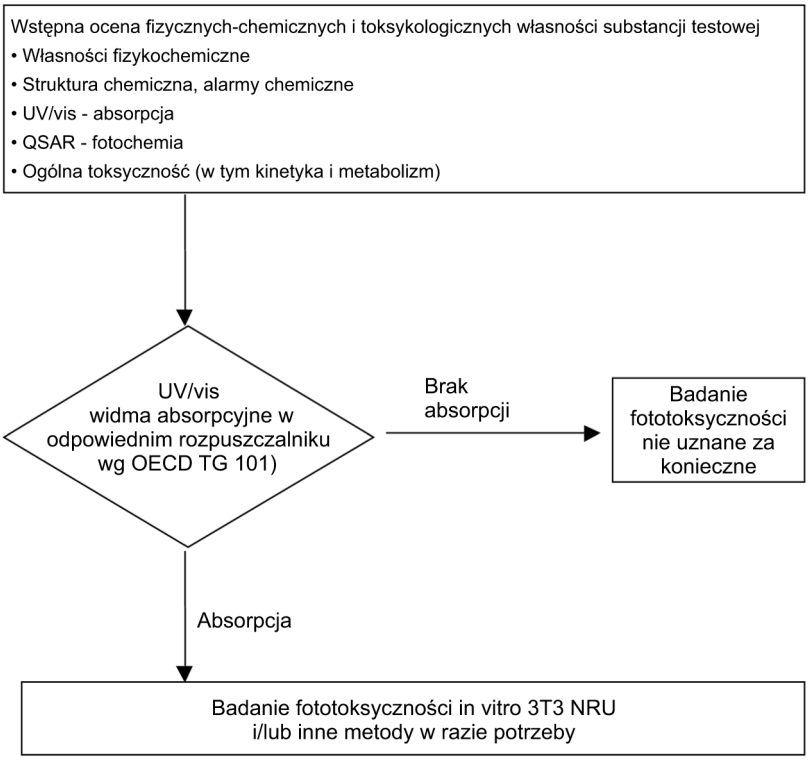
(19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445–462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

ZAŁĄCZNIK 1

Rola 3T3 NRU PT w sekwencyjnym podejściu do testowania fototoksyczności substancji chemicznych

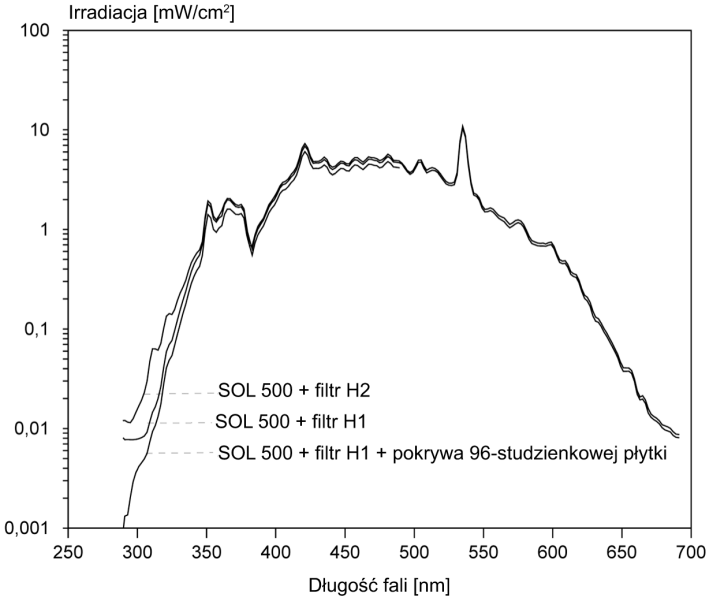


▼B

ZAŁĄCZNIK 2

Rysunek 1

Rozkład mocy widma symulatora światła słonecznego wyposażonego w filtry



(zob. część 1.4.1.5 akapit drugi)

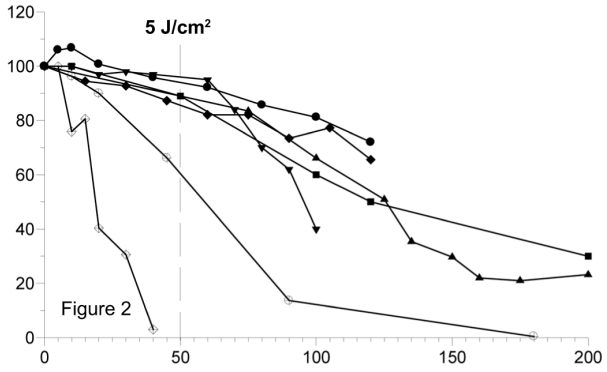
Na rysunku 1 podano przykład dopuszczalnego rozkładu widma irradiancji symulatora świata słonecznego wyposażonego w filtr. Opracowano na podstawie źródła halogenkowego stosowanego w badaniach walidacyjnych 3T3 NRU PT (6)(8)(17). Pokazano efekt dwóch różnych filtrów oraz dodatkowy efekt filtracyjny pokrywy 96-studzienkowej płytki do kultur komórkowych. Filtr H2 był stosowany wyłącznie w systemach testowych, które tolerują znaczną ilość UVB (model testu skórnego i test fotohemolizy krwinek czerwonych). W 3T3 NRU-PT stosowano filtr H1. Na rysunku widać, że dodatkowy efekt filtrujący pokrywy płytki występuje głównie w zakresie UVB, przy czym w widmie irradiacji wciąż jest wystarczająco dużo UVB, żeby wzbudzać substancje normalnie absorbujące promieniowanie w zakresie UVB, jak Amiodaron (zob. tabela 1).

▼B

Rysunek 2

Wrażliwość na irradiację komórek Balb/c 3T3 (mierzona w zakresie UVA)

Żywotność komórek (% wychwytu Red Neutral w kontrolach ciemnych)



(zob. część 1.4.1.5.2 akapit drugi); 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Wrażliwość komórek Balb/c 3T3 na irradiację przy stosowaniu symulatora światła słonecznego stosowanego w badaniach walidacyjnych testu toksyczności 3T3 NRU, mierzona w zakresie UVA. Na rysunku przedstawiono wyniki otrzymane w 7 różnych laboratoriach w badaniach przedwalidacyjnych (1). Dwie krzywe z otwartymi symbolami zostały uzyskane przy użyciu starych komórek (duża liczba pasaży), które musiały zostać zastąpione nowymi zasobami komórek; krzywe z wytłuszczonymi symbolami przedstawiają komórki z akceptowalną tolerancją na naświetlanie.

Na podstawie tych danych ustalono najwyższą niecytotoksyczną dawkę irradiacji 5 J/cm (pionowa linia przerywana). Pozioma linia przerywana pokazuje dodatkowo maksymalny akceptowalny efekt irradiacji, opisany w akapicie 1.4.2.2).

▼M3

B.42. DZIAŁANIE UCZULAJĄCE NA SKÓRĘ: BADANIE LOKALNYCH WĘZŁÓW CHŁONNYCH

WSTĘP

1. Wytyczne OECD w odniesieniu do badania chemikaliów i opracowane według nich metody badań UE są okresowo poddawane przeglądowi w związku z postępem naukowym, zmieniającymi się potrzebami regulacyjnymi oraz troską o dobrostan zwierząt. Pierwotna metoda badania (TM) przy określaniu działania uczulającego na skórę u myszy – badanie lokalnych węzłów chłonnych (LLNA); wytyczna OECD nr 429 dotycząca badań; rozdział B.42 niniejszego załącznika) została przyjęta już wcześniej (1). Szczegóły walidacji LLNA i przegląd powiązanej bibliografii opublikowano w (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Zaktualizowana metoda LLNA opiera się na ocenie doświadczeń i danych naukowych (12). Jest to druga TM opracowywana w celu oceny potencjału działania uczulającego na skórę przez chemikalia (substancje i mieszaniny) u zwierząt. Druga TM (tj. wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań; rozdział B.6 niniejszego załącznika) wykorzystuje badania na świnkach morskich, w szczególności test maksymalizacji na świnkach morskich oraz test Buehlera (13). LLNA jest korzystniejsza od metody B.6 i wytycznej OECD nr 406 (13) dotyczącej badań w odniesieniu do dobrostanu zwierząt. Ta zaktualizowana LLNA TM obejmuje zestaw norm efektywności (PS) (dodatek 1), które mogą być wykorzystywane do oceny statusu zatwierdzenia nowych lub zmodyfikowanych metod badania, które są funkcjonalnie i pod względem mechanistycznym podobne do LLNA, zgodnie z zasadami określonymi w wytycznych OECD nr 34 (14).

2. LLNA bada fazę indukcyjną uczulenia skóry i dostarcza danych ilościowych odpowiednich dla dokonania oceny dawka-reakcja. Trzeba zauważyć, że łagodne/umiarkowane czynniki uczulające, które zalecane są jako odpowiednie pozytywne substancje kontrolne dla metod testów na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań) (13) są również właściwe do stosowania w LLNA (6) (8) (15). Ograniczone podejście LLNA (rLLNA), w którym można by wykorzystywać do 40 % mniej zwierząt, jest również opisane jako opcja w tej TM (16) (17) (18). Metoda rLLNA może być wykorzystywana, jeśli istnieje potrzeba regulacyjna, aby potwierdzić negatywne oczekiwania co do potencjału działania uczulającego na skórę, pod warunkiem przestrzegania wszystkich innych specyfikacji protokołów LLNA, jak to opisano w niniejszej TM. Przewidywania negatywnego wyniku powinny opierać się na wszystkich dostępnych informacjach, o których mowa w pkt 4. Przed zastosowaniem podejścia rLLNA należy przedstawić jasne uzasadnienie i naukowe przesłanki uzasadniające jego stosowanie. Jeżeli, wbrew oczekiwaniom, uzyskuje się w rLLNA pozytywny lub niejednoznaczny wynik, konieczne mogą być dodatkowe badania w celu interpretacji lub wyjaśnienia nieprawidłowości. Metody rLLNA nie należy wykorzystywać do identyfikacji zagrożeń ze strony badanych substancji uczulających skórę w przypadku, gdy potrzebne są informacje dotyczące zależności dawka-reakcja w celach takich, jak dokonanie podziału na podkategorie na potrzeby rozporządzenia (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin oraz Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów ONZ.

DEFINICJE

3. Definicje są zamieszczone w dodatku 2.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

4. LLNA jest alternatywną metodą identyfikowania potencjalnych chemikaliów uczulających skórę. Nie oznacza to, że należy koniecznie we wszystkich przypadkach stosować LLNA zamiast testu na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań) (13), a tylko, że badanie to ma tę samą wartość merytoryczną i może zostać zastosowane jako badanie alternatywne, którego pozytywne lub negatywne wyniki nie wymagają już dalszego potwierdzenia Laboratorium badawcze powinno uwzględnić wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji przed rozpoczęciem badań. Informacje te powinny obejmować tożsamość i budowę

▼M3

chemiczną badanej substancji; jej właściwości fizyko-chemiczne; wyniki innych badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo* badanej substancji i dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie pokrewnych substancji chemicznych. Informacje te należy uwzględnić w celu ustalenia, czy LLNA jest odpowiednia dla substancji (ze względu na niezgodność ograniczonych rodzajów chemikaliów z LLNA – zob. pkt 5) oraz do pomocy przy doborze dawek.

5. Będąc metodą *in vivo*, LLNA nie eliminuje wykorzystania zwierząt w określaniu alergicznego kontaktowego działania uczulającego. Daje jednak potencjalne możliwości obniżenia liczby zwierząt potrzebnych do tego celu. Co więcej, LLNA oferuje znacznie bardziej udoskonalony sposób wykorzystywania zwierząt (mniej bólu i cierpienia) do badania alergicznego kontaktowego działania uczulającego. LLNA opiera się na obserwacji zjawisk immunologicznych zachodzących podczas fazy indukcyjnej uczulania. W odróżnieniu od testów na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań) (13), test LLNA nie wymaga wywoływania reakcji nadwrażliwości skóry poprzez prowokację. Ponadto LLNA nie wymaga zastosowania adiuwanta, jak wymaga tego test maksymalizacji na świnkach morskich (13). Tym samym LLNA zmniejsza ból i cierpienie zwierząt. Niezależnie od przewagi LLNA nad metodami B.6 i wytyczną OECD nr 406 dotyczącą badań, należy przyznać, że istnieją pewne ograniczenia, które mogą spowodować konieczność wykorzystania B.6 lub wytycznej OECD nr 406 (13) dotyczącej badań (np. fałszywe wyniki negatywne dla LLNA w przypadku niektórych metali, fałszywe wyniki pozytywne w przypadku niektórych środków drażniących skórę [takich jak niektóre chemikalia powierzchniowo czynne] lub rozpuszczalność badanej substancji) (19) (20). Ponadto klasy chemiczne lub substancje zawierające grupy funkcjonalne, co do których wykazano, że działają jako potencjalne czynniki zakłócające (21), mogą wymagać użycia badań na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (13). Co więcej, na podstawie ograniczonej bazy danych walidacyjnych, która składała się głównie z form użytkowych pestycydów, otrzymanie pozytywnego wyniku dla tego rodzaju badanych substancji jest bardziej prawdopodobne w przypadku LLNA niż w przypadku testów na świnkach morskich (22). Jednak podczas badania form użytkowych można rozważyć wykorzystanie podobnych substancji o znanych wynikach jako substancji referencyjnych w celu wykazania, że LLNA działa prawidłowo (zob. pkt 16). Poza tymi przypadkami zidentyfikowanych ograniczeń LLNA powinna być stosowana do badania wszelkich substancji, chyba że istnieją właściwości związane z tymi substancjami, które mogą zakłócać dokładność LLNA.

ZASADA BADANIA

6. Podstawową zasadą u podłoża LLNA jest fakt, iż czynniki uczulające wywołują pierwotną proliferację limfocytów w węźle chłonnym odprowadzającym limfę z miejsca przyłożenia badanej substancji. Ta proliferacja jest proporcjonalna do zastosowanej dawki oraz potencjału zastosowanego alergenu i jest prostym środkiem uzyskania ilościowego pomiaru uczulenia. Proliferacja jest mierzona przez porównanie średniej proliferacji w każdej badanej grupie do średniej proliferacji w grupie kontrolnej otrzymującej nośnik (VC). Określa się stosunek średniej proliferacji w każdej grupie poddanej działaniu środka do średniej proliferacji w równoległej grupie VC, który jest nazywany wskaźnikiem stymulacji (SI) i powinien wynosić ≥ 3 zanim substancja badana zostanie zaklasyfikowana jako potencjalny czynnik uczulający skórę. Procedury opisane w niniejszym dokumencie są oparte na wykorzystaniu do pomiaru *in vivo* znakowania markerem promieniotwórczym zwiększonej liczby komórek rozmnażających się wegetatywnie w odprowadzających usznych węzłach chłonnych. Można jednak zastosować inne punkty końcowe do oceny liczby rozmnażających się komórek, pod warunkiem że wymogi PS są całkowicie spełnione (dodatek 1).

▼M3

OPIS BADANIA

Dobór gatunków zwierząt

7. Mysz jest gatunkiem preferowanym do tego badania. Używa się młodych, dorosłych samic myszy szczepów CBA/Ca lub CBA/J, które nie rodziły i nie są ciężarne. Na początku doświadczenia samice powinny mieć 8–12 tygodni, a zróżnicowanie mas ciała poszczególnych zwierząt powinno być minimalne i nie przekraczać 20 % średniej masy ciała. Można ewentualnie wykorzystać inne szczepy i samce, jeżeli otrzymano wystarczające dowody na to, że nie istnieją znaczące specyficzne różnice w reakcji na LLNA w zależności od szczepu i/lub płci.

Warunki w pomieszczeniach dla zwierząt i pożywienie

8. Myszy powinny być trzymane w grupach (23), chyba że istnieją odpowiednie naukowe przesłanki dla trzymania myszy pojedynczo. Temperatura w badawczych pomieszczeniach hodowlanych powinna wynosić 22 ± 3 °C. Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej.

Przygotowanie zwierząt

9. Zwierzęta wybierane są losowo i znakowane w sposób umożliwiający indywidualną identyfikację (ale nie przez jakiekolwiek znaki na uszach) i trzymane w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem dawkowania w celu umożliwienia zaaklimatyzowania do warunków laboratoryjnych. Przed rozpoczęciem podawania bada się wszystkie zwierzęta w celu upewnienia się, że nie mają żadnych zauważalnych zmian skórnych.

Przygotowanie roztworów dozujących

10. Stałe substancje powinny zostać rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczone, jeżeli jest to odpowiednie, przed zastosowaniem na uchu myszy. Chemikalia płynne można zastosować czyste lub rozcieńczone przed dawkowaniem. Chemikalia nierozpuszczalne, takie jak te najczęściej spotykane w wyrobach medycznych, należy poddać ekstrakcji w warunkach wyjątkowych w odpowiednim rozpuszczalniku w celu wykrycia wszystkich możliwych do wyekstrahowania składników do badania przed zastosowaniem na uchu myszy. Substancje badane należy przygotowywać codziennie, chyba że dane dotyczące stabilności wykazują dopuszczalność składowania.

Sprawdzenie wiarygodności

11. Pozytywne substancje kontrolne (PC) wykorzystuje się do wykazania właściwego działania badania poprzez reakcję badanej substancji uczulającej z odpowiednią i powtarzalną czułością, dla której wielkość reakcji jest dobrze scharakteryzowana. Włączanie kolejnych PC jest zalecane, ponieważ potwierdza się w ten sposób kompetencje laboratorium do skutecznego przeprowadzenia każdego badania i umożliwia dokonanie oceny odtwarzalności i porównywalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej. Niektóre organy regulacyjne wymagają PC dla każdego badania i w związku z tym użytkownicy są zachęcani do przeprowadzenia konsultacji z właściwymi organami przed rozpoczęciem LLNA. Odpowiednio zaleca się rutynowe wykorzystywanie równoległej PC, aby uniknąć potrzeby dodatkowych badań na zwierzętach do spełnienia tych wymagań, które mogą powstać w związku ze stosowaniem okresowej PC (zob. pkt 12). PC powinna dać w teście LLNA odpowiedź pozytywną na poziom narażenia na działanie, przy którym oczekuje się wzrostu wskaźnika stymulacji (SI) > 3 więcej niż w grupie kontroli negatywnej (NC). Dawkę PC należy dobrać w taki sposób, by nie powodować nadmiernego podrażnienia skóry lub ogólnoustrojowej toksyczności, a indukcja była powtarzalna, ale nie nadmierna (tj.

▼M3

SI > 20 byłyby zbyt wysokie). Preferowana PC to 25 % aldehydu cynamonowego heksylu (Chemical Abstracts Service [CAS] nr 101-86-0) w acetonie: oliwie z oliwek (w proporcji objętościowej 4:1 v/v) i 5 % merkaptobenzotiazolu (CAS nr 149-30-4) w N,N,-dimetyloformamidzie (zob. dodatek 1, tabela 1). Mogą zaistnieć okoliczności, w których można użyć innych PC spełniających powyższe kryteria, pod warunkiem że istnieje po temu odpowiednie uzasadnienie.

12. Pomimo że zaleca się włączenie równoległej grupy PC, mogą zaistnieć sytuacje, w których okresowe badanie PC (tj. w odstępach nie dłuższych niż 6 miesięcy) może okazać się wystarczające w przypadku laboratoriów, które regularnie przeprowadzają badanie LLNA (tj. przeprowadzają badanie LLNA co najmniej raz na miesiąc) i dysponują wcześniejszymi danymi z pozytywnych kontroli, świadczącymi o tym, że laboratorium jest w stanie uzyskiwać odtwarzalne i dokładne wyniki w pozytywnych kontrolach. Można wykazać odpowiedni poziom biegłości w wykonywaniu badania LLNA, uzyskując stałe pozytywne wyniki PC w co najmniej 10 niezależnych badaniach przeprowadzonych w rozsądnym terminie (tj. w okresie krótszym niż rok).

13. Należy zawsze włączać równoległą grupę PC, jeśli zachodzi proceduralna zmiana w LLNA (np. zmiana przeszkolonego personelu, zmiany w metodzie badania materiałów i/lub odczynników, zmiany w metodzie badania urządzenia, zmiana źródła zwierząt testowych), a przedmiotowe zmiany powinny być udokumentowane w laboratoryjnych sprawozdaniach. Należy zwrócić uwagę na wpływ tych zmian na odpowiedniość ustalonych wcześniej danych przy określaniu konieczności zgromadzenia nowej bazy danych, aby udokumentować spójność wyników PC.

14. Badacze powinni być świadomi, że decyzja o przeprowadzeniu badania PC na zasadzie okresowej zamiast równolegle wywiera wpływ na odpowiedniość i akceptowalność negatywnych wyników badań uzyskanych bez równoległej PC w okresie pomiędzy każdym okresowym badaniem PC. Na przykład, jeżeli w okresowych PC uzyskany zostaje wynik fałszywie negatywny, negatywne wyniki substancji badanej uzyskane w okresie między ostatnim dopuszczalnym okresowym badaniem PC i niedopuszczalnym okresowym badaniem PC mogą być kwestionowane. Należy dokładnie rozważyć tego rodzaju skutki przy podejmowaniu decyzji, czy należy włączyć równoległą PC, czy tylko przeprowadzać PC na zasadzie okresowej. Należy również wziąć pod uwagę możliwość wykorzystania mniejszej liczby zwierząt w ramach grupy równoległej PC, jeżeli jest to naukowo uzasadnione, oraz jeżeli laboratorium może wykazać, w oparciu o wcześniej zgromadzone dane, że można wykorzystać mniejszą liczbę myszy (12).

15. Chociaż substancja kontroli pozytywnej powinna być testowana w nośniku, o którym wiadomo, że wywołuje konsekwentną reakcję (np. aceton: oliwa z oliwek; w proporcji objętościowej 4:1, v/v), mogą jednak zaistnieć pewne sytuacje wynikające z przepisów, w których przetestowanie w niestandardowym nośniku (o formulacji odpowiedniej klinicznie/chemicznie) może być również konieczne (24). Jeżeli równoległa PC jest badana w innym nośniku niż substancja badana, wówczas należy włączyć oddzielną VC w odniesieniu do równoległej PC.

16. W przypadkach gdy ocenia się substancje badane konkretnej klasy chemicznej lub dające pewien zakres reakcji, substancje wzorcowe mogą służyć także temu, aby wykazać, czy metoda badawcza jest odpowiednia dla dokonania oceny potencjalnego działania uczulającego na skórę tego rodzaju badanych substancji. Odpowiednie substancje wzorcowe powinny posiadać następujące właściwości:

— strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do klasy badanej substancji,

— znane właściwości fizyczne i chemiczne,

— dane potwierdzające z LLNA,

— dane potwierdzające z innych modeli zwierzęcych i/lub ludzkich.

▼M3

PROCEDURA BADANIA

Liczba zwierząt i poziomy dawek

17. W każdej grupie badanej powinny być użyte nie mniej niż cztery zwierzęta, z minimalną liczbą trzech stężeń badanej substancji oraz negatywną grupą kontrolną otrzymującą jedynie nośnik badanej substancji i pozytywną grupą kontrolną (równoległą lub najnowszą, zgodnie z podejściem laboratorium, bierze się pod uwagę pkt 11–14). Należy rozważyć zbadanie wielu dawek PC, szczególnie gdy badanie PC jest prowadzone na zasadzie nieregularnej. Z wyjątkiem zastosowania substancji badanej, ze zwierzętami grup kontrolnych należy się obchodzić w sposób identyczny jak ze zwierzętami grup badanych.

18. Dobór dawek i wybór nośnika powinien być oparty na zaleceniach podanych w pozycjach (3) i (5) bibliografii. Kolejne dawki zazwyczaj wybiera się z odpowiedniego szeregu stężeń, takich jak 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % itd. Do wyboru szeregu stężeń należy dołączyć odpowiednie naukowe uzasadnienie. O ile są dostępne, należy uwzględnić wszystkie istniejące informacje toksykologiczne (np. o ostrej toksyczności i o podrażnieniu skóry) oraz o strukturalnych i fizykochemicznych właściwościach badanej substancji (i/lub substancji zbliżonych pod względem budowy) przy wyborze trzech kolejnych stężeń, tak aby najwyższe stężenie maksymalizowało narażenie, nie doprowadzając jednak do ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry (3) (25). W przypadku braku takich informacji może okazać się konieczne przeprowadzenie badania wstępnego (zob. pkt 21–24)

19. Nośnik nie powinien zakłócać wyniku badania lub wpływać na niego oraz powinien być wybrany na podstawie maksymalizowania rozpuszczalności w celu uzyskania najwyższego osiągalnego stężenia, dając jednocześnie możliwość uzyskania roztworu/zawiesiny nadającej się do podania substancji badanej. Zalecanymi nośnikami są aceton: oliwa z oliwek (w proporcji objętościowej 4:1 v/v), N,N-dimetyloformamid, metylo-etyloketon, glikol propylenowy i sulfotlenek dimetylowy (19), ale mogą być użyte inne, jeśli przedstawi się wystarczające uzasadnienie naukowe. W niektórych sytuacjach może okazać się konieczne użycie, jako dodatkowej kontroli, rozpuszczalnika odpowiedniego ze względów klinicznych, lub postaci handlowej, w której badana substancja wprowadzana jest na rynek. Szczególną uwagę należy zwrócić na zapewnienie, aby hydrofilne substancje badane zostały włączone do systemu nośnika, który nawilża skórę i nie spływa z niej natychmiast, przez włączenie odpowiednich środków zwiększających rozpuszczalność (np. 1 % Pluronic ® L92). A zatem należy unikać roztworów całkowicie wodnych.

20. Przetwarzanie węzłów chłonnych z poszczególnych myszy umożliwia ocenę zmienności pomiędzy zwierzętami oraz statystyczne porównanie różnicy między substancją badaną i pomiarami grupy VC (zob. pkt 35). Ponadto dokonanie oceny możliwości obniżenia liczby myszy w grupie PC jest wykonalne wówczas, gdy gromadzone są dane dotyczące poszczególnych zwierząt (12). Co więcej, niektóre organy regulacyjne wymagają zbierania danych dotyczących poszczególnych zwierząt. Niemniej jednak połączenie danych dotyczących zwierząt może być uznane za możliwe do przyjęcia przez niektóre organy regulacyjne i w takich przypadkach użytkownicy mogą mieć możliwość gromadzenia indywidualnych lub połączonych danych dotyczących zwierząt.

Badanie wstępne

21. W przypadku braku informacji pozwalającej określić najwyższą dawkę, jaka ma zostać zbadana (zob. pkt 18), należy przeprowadzić badanie wstępne w celu określenia właściwego poziomu dawki do badania w metodzie LLNA. Celem badania wstępnego jest opracowanie wytycznych dotyczących wyboru maksymalnej dawki, jaką należy stosować w głównym badaniu LLNA, w przypadku gdy nie dysponuje się informacjami na temat stężenia powodującego toksyczność ogólnoustrojową (zob. pkt 24) i/lub nadmierne miejscowe podrażnienie skóry (zob. pkt 23). Maksymalny poziom badanej dawki powinien wynosić 100 % substancji badanej w przypadku cieczy lub maksymalne możliwe stężenie w przypadku ciał stałych lub zawiesin.

▼M3

22. Badanie wstępne przeprowadza się w warunkach identycznych do tych, w jakich przeprowadza się główne badanie LLNA, z tym że nie przeprowadza się oceny proliferacji węzła chłonnego oraz można wykorzystać mniejszą liczbę zwierząt w grupie badanej. Zaleca się jedno lub dwa zwierzęta w grupie badanej. Wszystkie myszy będą obserwowane codziennie pod kątem jakichkolwiek klinicznych oznak toksyczności ogólnoustrojowej lub miejscowego podrażnienia skóry w miejscu zastosowania. Masy ciała są rejestrowane przed badaniem i przed jego zakończeniem (dzień 6.). Obydwoje uszu każdej myszy bada się pod kątem wystąpienia rumienia i ocenia przy wykorzystaniu tabeli 1 (25). Pomiary grubości ucha są przeprowadzane przy wykorzystaniu grubościomierza (np. cyfrowych mikrometrów lub grubościomierzem Peacock Dial) w dniu 1. (przed podaniem substancji), w dniu 3. (około 48 godzin następujących po podaniu pierwszej dawki) oraz w dniu 6. Ponadto w dniu 6. grubość ucha można określić za pomocą kolczykownicy do pomiaru masy, co powinno być przeprowadzone po uśmierceniu zwierząt w humanitarny sposób. Nadmierne miejscowe podrażnienie skóry jest sygnalizowane wystąpieniem rumienia o wyniku ≥ 3 i/lub zwiększeniem grubości ucha ≥ 25 % w dniu pomiaru (26) (27). Najwyższa dawka wybrana do głównego badania LLNA to następna niższa dawka w szeregu stężeń badania wstępnego (zob. pkt 18), która nie wywołuje ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry.

Tabela 1

Ocena punktowa rumienia

Objawy	Wynik
Brak rumienia	0
Bardzo lekki rumień (prawie niewidoczny)	1
Wyraźny rumień	2
Rumień umiarkowany do mocnego	3
Mocny rumień (czerwień przypominająca barwę mięsa czerwonego) do form obrzęku wykluczających klasyfikację rumienia	4

23. Oprócz 25 % zwiększenia grubości ucha (26) (27), do zidentyfikowania substancji drażniących w metodzie LLNA wykorzystywano też statystycznie istotne zwiększenie grubości ucha u myszy badanych w porównaniu z myszami kontrolnymi (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). O ile jednak statystycznie znaczące zwiększenie może wystąpić przy grubości ucha mniejszej niż 25 %, to nie udało się go powiązać z nadmiernym podrażnieniem (30) (32) (33) (34).

24. Następujące obserwacje kliniczne mogą wskazywać na toksyczność ogólnoustrojową (35) (36), jeśli są wykorzystywane jako część zintegrowanej oceny i w związku z tym mogą określać maksymalne dawki do stosowania w LLNA: zmiany w funkcjach układu nerwowego (np. piloerekcja, ataksja, drżenia oraz konwulsje); zmiany w zachowaniu (na przykład agresja, zmiany w czyszczeniu, wyraźna zmiana w poziomie aktywności); zmiany w sposobie oddychania (np. zmiany w częstotliwości i intensywności oddychania, takie jak duszność, dyszenie oraz rzężenie), a także zmiany w konsumpcji żywności i wody. Ponadto w ocenie należy wziąć pod uwagę oznaki stanów zwiększonej senności i/lub brak reakcji oraz wszelkie objawy kliniczne sygnalizujące coś więcej niż niewielki lub chwilowy ból i cierpienie, lub > 5 % spadek masy ciała od dnia 1. do dnia 6. czy śmiertelność. Zwierzęta konające oraz zwierzęta wykazujące oczywiste oznaki bólu czy oznaki ostrego i przewlekłego strachu powinny zostać uśmiercone w sposób humanitarny (37).

▼M3

Harmonogram doświadczalny głównego badania

25. Harmonogram doświadczalny badania jest następujący:

— *Dzień 1:* Indywidualnie określić i odnotować wagę każdego zwierzęcia oraz wszelkie obserwacje kliniczne. Stosuje się 25 µl właściwego roztworu lub samego nośnika, lub kontroli pozytywnej (równoległej lub najnowszej, na podstawie polityki laboratoryjnej, bierze się pod uwagę pkt 11–15), na część grzbietową każdego ucha.

— *Dzień 2 i 3:* Powtórzyć procedurę stosowania przeprowadzoną w dniu 1.

— *Dzień 4 i 5:* Bez podawania.

— *Dzień 6:* Zanotować masę każdego zwierzęcia. Podać w iniekcji 250 µl sterylnego roztworu chlorku sodu buforowanego fosforanami (PBS) zawierającego 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) (^{3}H) -metylotymidyny znakowanej trytem wszystkim zwierzętom badanym i kontrolnym przez żyłę ogonową. Alternatywnie podać w iniekcji 250 µl sterylnego PBS zawierającego 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-jododezoksyuridiny i 10^{-5}M fluorodezoksyuridiny wszystkim myszom przez żyłę ogonową. Pięć godzin (5 h) później uśmiercić w sposób humanitarny zwierzęta. Wyciąć uszne węzły chłonne z każdego ucha myszy i przetwarzać razem w PBS dla każdego zwierzęcia (traktowanie w ujęciu osobniczym); alternatywnie wyciąć i zebrać węzły chłonne z każdego ucha w PBS z każdej grupy badanej (traktowanie zbiorcze w ujęciu grupowym). Informacje i schematy identyfikacji i rozbioru węzła chłonnego można znaleźć w pozycji (12). Do celów dalszego monitorowania miejscowych reakcji skóry w badaniu głównym, w protokole badania można uwzględnić dodatkowe parametry, takie jak punktacja rumienia ucha lub pomiar grubości ucha (zrobiony za pomocą grubościomierza lub za pomocą kolczykownicy do pomiaru masy w czasie sekcji).

Przygotowanie zawiesiny komórek

26. Zostaje przygotowana jedna wspólna porcja zawiesiny z komórek węzła chłonnego (LNC) usuniętych obustronnie u pojedynczych zwierząt albo z połączonych grup badanych przez delikatne mechaniczne rozdzielenie agregatów na siateczce ze stali nierdzewnej o oczkach wielkości 200 µm lub za pomocą innych możliwych do przyjęcia technik służących tworzeniu jednokomórkowych zawiesin. Komórki węzłów chłonnych są przemywane dwukrotnie pozostałym PBS, a DNA jest strącane 5 % kwasem trichlorooctowym (TCA) w 4 oC przez 18 godzin (3). Peletki są albo zawieszane ponownie w 1 mL TCA i przenoszone do fiolek scyntylacyjnych zawierających 10 mL płynu scyntylacyjnego do policzenia ^{3}H, lub też przenoszone bezpośrednio do fiolek do liczenia impulsów gamma, w celu liczenia impulsów ^{125}I.

Określenie proliferacji komórek (wbudowanie związku promieniotwórczego)

27. Wbudowanie ^{3}H-metylotymidyny mierzone jest przez liczenie impulsów β-scyntylacji jako liczba rozpadów na minutę (DPM). Wbudowywanie ^{125}I-jododezoksyuridiny mierzone jest jako impulsy ^{125}I i również wyrażane jako DPM. W zależności od zastosowanego podejścia, wbudowanie wyrażane jest jako DPM/mysz (ujęcie osobnicze) lub DPM/grupa badana (ujęcie zbiorcze).

Ograniczone podejście LLNA

28. W pewnych sytuacjach, jeśli zachodzi potrzeba regulacyjna, aby potwierdzić negatywne oczekiwania co do potencjału działania uczulającego na skórę, można zastosować fakultatywny protokół rLLNA (16) (17) (18) z wykorzystaniem mniejszej liczby zwierząt, pod warunkiem że są przestrzegane wszystkie inne specyfikacje protokołu LLNA w tej TM. Przed zastosowaniem podejścia rLLNA należy przedstawić jasne uzasadnienie i naukowe przesłanki uzasadniające jego stosowanie. Jeżeli uzyskuje się wynik pozytywny lub niejednoznaczny, mogą się okazać konieczne dodatkowe badania w celu interpretacji lub wyjaśnienia nieprawidłowości.

▼M3

29. Zmniejszenie liczby grup badanych jest jedyną różnicą między protokołami badania metod LLNA i rLLNA i z tego powodu rLLNA nie dostarcza informacji na temat relacji między dawką a reakcją. Dlatego też rLLNA nie należy stosować w przypadku, gdy potrzebne są informacje na temat relacji między dawką a reakcją. Podobnie jak w wielodawkowym LLNA, stężeniem substancji badanej ocenianym w rLLNA powinno być maksymalne stężenie, które nie wywołuje widocznej ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry u myszy (zob. pkt 18).

OBSERWACJE

Obserwacje kliniczne

30. Zwierzęta poddaje się starannej obserwacji klinicznej raz dziennie pod kątem jakichkolwiek oznak klinicznych, czy to miejscowego podrażnienia w miejscu zastosowania czy też ogólnoustrojowej toksyczności. Wszystkie obserwacje kliniczne są systematycznie odnotowywane w postaci zapisów prowadzonych dla każdej myszy. Plany monitorowania powinny obejmować kryteria umożliwiające szybką identyfikację tych myszy, które wykazują oznaki toksyczności ogólnoustrojowej, nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry lub żrącego działania na skórę, w celu eutanazji (37).

Masy ciała

31. Jak wskazano w pkt 25, indywidualne masy ciała określane są na początku badania i przy planowanym humanitarnym uśmierceniu zwierząt.

OBLICZANIE WYNIKÓW

32. Wyniki dla każdej grupy badanej są wyrażane jako SI. Jeżeli zastosowano ujęcie osobnicze, SI otrzymuje się przez podzielenie średniej wartości DPM/mysz w obrębie każdej grupy dawkowania badanej substancji i grupy pozytywnej kontroli przez średnią wartość DPM/zwierzę dla grupy kontrolnej rozpuszczalnika/nośnika. Średnie SI dla grup VC wynosi zatem jeden. Przy zastosowaniu ujęcia zbiorczego, SI otrzymuje się przez podzielenie zbiorczego wbudowania związku promieniotwórczego dla każdej grupy badanej przez wbudowanie w zbiorczej próbie grupy VC; to daje średnie SI.

33. W procesie decyzyjnym wynik uznawany jest za pozytywny, jeśli SI $\geq$ 3. Jednakże siła reakcji na dawkę, znaczenie statystyczne i spójność reakcji rozpuszczalnik/nośnik i PC mogą również być stosowane przy ustalaniu, czy wynik graniczny można uznać za pozytywny (4) (5) (6).

34. Jeżeli zachodzi potrzeba objaśnienia otrzymanych wyników, należy rozważyć różne własności badanej substancji, w tym rozważyć, czy jest strukturalnie pokrewna znanym czynnikom uczulającym, czy powoduje nadmierne podrażnienie skóry u myszy, a także rozważyć charakter zaobserwowanej relacji dawka-reakcja. Te i inne względy omówione są szczegółowo gdzie indziej (7).

35. Gromadzenie danych dotyczących radioaktywności na poziomie poszczególnych myszy umożliwi analizę statystyczną danych w odniesieniu do obecności i relacji dawka-reakcja. Ocena statystyczna może obejmować ocenę relacji między dawką a reakcją, jak również odpowiednio dostosowane porównania badanych grup (np. grupa badana w parach w porównaniu do równoległej grupy kontrolnej otrzymującej nośnik). Analizy statystyczne mogą obejmować np. regresję liniową lub badanie Williamsa w celu dokonania oceny tendencji w relacji między dawką a reakcją oraz badanie Dunnetta w odniesieniu do porównań par. Przy wyborze właściwej metody analizy statystycznej danych prowadzący badanie powinien zachować świadomość możliwej nierówności wariancji lub innych powiązanych problemów, które mogą spowodować konieczność transformacji danych lub przeprowadzenia nieparametrycznej analizy statystycznej. W każdym przypadku prowadzący badanie musi liczyć się z koniecznością przeprowadzenia obliczeń SI i analiz statystycznych z wykorzystaniem pewnych punktów danych i bez nich (tzw. „wartości odstające”).

▼M3

DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Dane

36. Dane należy przedstawić w formie tabeli. Przy wykorzystaniu podejścia w ujęciu osobniczym należy przedstawić wartości DMP dla poszczególnych zwierząt, średnią wartość DPM/zwierzę w danej grupie, związana wartość błędu (np. SD, SEM), oraz średnie SI dla każdej grupy badanej porównywane z równoległą grupą VC. Przy wykorzystaniu ujęcia zbiorczego należy wskazać średnią/medianę DPM i średnie SI dla każdej grupy badanej porównane z równoległą grupą VC.

Sprawozdanie z badań

37. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Substancje: badana i kontrolna:

— dane identyfikacyjne (np. numery CAS lub WE, jeśli są dostępne); źródło: czystość; znane zanieczyszczenia; numer partii),

— cechy fizyczne i własności fizykochemiczne (np. lotność, stabilność, rozpuszczalność),

— jeżeli jest to mieszanina, skład i względne udziały procentowe składników.

Rozpuszczalnik/nośnik:

— dane identyfikacyjne (czystość; stężenie, tam gdzie stosowne; wykorzystane objętości),

— uzasadnienie wyboru nośnika.

Zwierzęta badane:

— źródło, z którego pochodzą myszy szczepu CBA,

— status mikrobiologiczny zwierząt, jeśli jest znany,

— liczba i wiek zwierząt,

— źródło pochodzenia zwierząt, warunki środowiska, pokarm itp.

Warunki badania:

— szczegóły przygotowania i stosowania substancji badanej,

— uzasadnienie doboru dawek (łącznie z wynikami z badania wstępnego, jeśli było przeprowadzane),

— nośnik i użyte stężenia substancji testowej oraz całkowita ilość zastosowanej substancji badanej,

— szczegóły dotyczące jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety, źródło wody),

— szczegóły dotyczące poddania działaniu substancji oraz harmonogramów pobierania próbek,

— metody pomiaru toksyczności,

— kryteria uznawania badań za pozytywne lub negatywne,

— szczegóły dotyczące protokołu odchyleń i wyjaśnienie, w jaki sposób odchylenie ma wpływ na planowanie badań i ich wynik.

Sprawdzenie wiarygodności:

— podsumowanie wyników ostatniego sprawdzenia wiarygodności, w tym informacji o wykorzystanej substancji badanej, stężeniach i nośniku,

— równoległe i/lub wcześniejsze pozytywne i negatywne dane kontroli laboratorium prowadzącego badanie,

▼M3

— jeżeli nie włączono równoległej grupy PC, data i sprawozdanie laboratoryjne z ostatniego okresowego PC i sprawozdanie wyszczególniające wcześniejsze dane dotyczące PC dla danego laboratorium, uzasadniające przyczyny dla których nie przeprowadzono PC równolegle.

Wyniki:

— masa poszczególnych myszy na początku dawkowania i przy planowanym uśmierceniu; jak również średnia i opis powiązanego błędu (np. SD, SEM) w odniesieniu do każdej grupy badanej,

— przebieg czasowy pojawienia się i oznaki toksyczności, w tym podrażnień skóry w miejscu podania, jeśli takie wystąpiły, u każdego zwierzęcia,

— tabelę indywidualnych (podejście w ujęciu osobniczym) lub średnich/mediana (ujęcie zbiorcze) wartości DPM oraz SI dla każdej grupy badanej,

— średnią oraz opis powiązanego błędu (np. SD, SEM) dla wartości DPM/mysz dla każdej grupy badanej i wyniki analizy wartości odstających dla każdej grupy badanej przy zastosowaniu podejścia osobniczego,

— obliczone SI i odpowiednią miarę zmienności, uwzględniającą zmienność między zwierzętami w obu grupach: substancji badanej i kontrolnej przy użyciu podejścia osobniczego,

— relacja dawka-reakcja,

— analizy statystyczne, tam gdzie stosowne.

Omówienie wyników:

— krótki komentarz do wyników, analiza zależności reakcji od dawki oraz w stosownych przypadkach, analizy statystyczne, z wnioskiem czy substancja testowa powinna być uznana za czynnik uczulający skórę.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paryż. Dostępny na stronie: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165–169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 1–31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999–1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985–997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327–33.

▼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, 49–59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258–273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274–286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249–257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostępny na stronie: [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, Paryż. Dostępny na stronie: [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, Paryż. Dostępny na stronie: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281–284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181–185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, Kwiecień 2007. Dostępny na stronie: [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. Dostępny na stronie: [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. Dostępny na stronie: [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, 1896–1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, dostępne na stronie: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71–89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paryż, France. Dostępny na stronie: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostępny na stronie: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023–1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paryż, France. Dostępny na stronie: [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, Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paryż. Dostępny na stronie: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

Dodatek 1

Normy efektywności do celów oceny proponowanych podobnych do LLNA lub zmodyfikowanych metod badania działania uczulającego na skórę

WSTĘP

1. Normy efektywności służą przede wszystkim ustaleniu, w jaki sposób określić, czy nowe metody badań, zarówno zastrzeżone (tj. chronione prawem autorskim czy znakiem towarowym, zarejestrowane), jak i niezastrzeżone, są wystarczająco dokładne i wiarygodne w odniesieniu do konkretnych celów badawczych. Te normy efektywności, opracowane na podstawie zatwierdzonych i zaakceptowanych metod badawczych, mogą być wykorzystane do oceny wiarygodności i dokładności innych podobnych metod (nazywanych potocznie metodami „me-too"), które opierają się na podobnych zasadach naukowych i mierzą lub przewidują te same skutki biologiczne lub toksyczne (14).

2. Przed przyjęciem zmodyfikowanych metod (tj. proponowanych ewentualnych usprawnień do zatwierdzonej metody badań) należy dokonać oceny w celu określenia wpływu proponowanych zmian na działanie badania oraz zakres, w jakim zmiany takie mają wpływ na informacje dostępne dla innych elementów procesu zatwierdzania. W zależności od liczby i charakteru proponowanych zmian, wygenerowanych danych i towarzyszącej tym zmianom dokumentacji, powinny one być poddawane takiemu samemu procesowi walidacji, jak opisano w odniesieniu do nowego badania, lub, w stosownych przypadkach, ograniczonej ocenie wiarygodności i istotności przy użyciu sprawdzonej normy efektywności (14).

3. Podobne lub zmodyfikowane metody zaproponowane w ramach tej TM należy poddać ocenie w celu określenia ich wiarygodności i dokładności przy użyciu substancji chemicznych reprezentujących pełne spektrum ocen LLNA. W celu uniknięcia nieuzasadnionego wykorzystywania zwierząt zaleca się, aby naukowcy opracowujący modele zasięgnęli opinii właściwych władz przed rozpoczęciem badania walidacyjnego zgodnie z normami efektywności i wytycznymi zamieszczonymi w niniejszej TM.

4. Niniejsze normy efektywności opierają się na normach US-ICCVAM, EC-ECVAM oraz japońskiej zharmonizowanej normie efektywności JaCVAM (12), służących do oceny wiarygodności metod podobnych do LLNA lub zmodyfikowanych jej wersji. Norma efektywności składa się z zasadniczych elementów metody badania, zalecanych substancji odniesienia i norm dotyczących dokładności i wiarygodności, które proponowana metoda powinna spełniać lub przewyższać.

I. **Istotne elementy metody badania**

5. W celu zagwarantowania, że zmodyfikowana wersja metody LLNA lub metoda podobna do niej jest pod względem funkcjonalnym i mechanistycznym analogiczna do LLNA i mierzy ten sam biologiczny skutek, w protokole metody badania powinny zostać uwzględnione następujące elementy:

— substancja badana powinna być stosowana miejscowo na obu uszach myszy,

— proliferacja limfocytów powinna być mierzona w węzłach chłonnych odprowadzających z miejsca stosowania badanej substancji,

— proliferacja limfocytów powinna być mierzona w fazie indukcyjnej uczulenia skóry,

▼M3

— wybraną dla badanej substancji najwyższą dawką powinno być maksymalne stężenie, które nie wywołuje ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry u myszy. Dla pozytywnej chemicznej substancji odniesienia, najwyższa dawka powinna być co najmniej tak duża, jak wartości LLNA EC3 odpowiednich chemicznych substancji odniesienia (zob. tabela 1) bez wywoływania ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry u myszy,

— powinna zostać włączona równoległa VC do każdego badania oraz, w stosownych przypadkach, powinny być również wykorzystane równoległe PC,

— w grupie badanej powinny być wykorzystane co najmniej cztery zwierzęta,

— można gromadzić indywidualne lub zbiorcze dane z badań na zwierzętach.

Jeżeli którekolwiek z tych kryteriów nie jest spełnione, wówczas dane normy efektywności nie mogą być wykorzystywane do zatwierdzania podobnych lub zmodyfikowanych metod.

II. **Minimalny wykaz chemicznych substancji odniesienia**

6. W normach US-ICCVAM, EC-ECVAM oraz japońskiej zharmonizowanej normie efektywności JaCVAM (12) zidentyfikowano 18 podstawowych chemicznych substancji odniesienia, które należy wykorzystywać, i cztery nieobowiązkowe chemiczne substancje odniesienia (tj. substancje, które w LLNA: DA dają fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne wyniki, jeśli porównać je do wyników badań na ludziach i na świnkach morskich (B.6 i wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań) (13), i z tego względu umożliwiają wykazanie, że dana metoda działa równie dobrze jak LLNA lub ją przewyższa), które włączono do normy efektywności dotyczącej LLNA. W celu zidentyfikowania tych substancji chemicznych posłużono się następującymi kryteriami:

— wykaz chemicznych substancji odniesienia reprezentuje typy substancji zazwyczaj badane w odniesieniu do potencjalnego działania uczulającego na skórę i do zakresu reakcji, które LLNA jest w stanie mierzyć lub przewidywać,

— substancje mają ściśle określone chemiczne struktury,

— udostępniono dla każdej substancji dane LLNA z badań na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań) (13) oraz, tam gdzie możliwe, dane z badań na ludziach, oraz

— substancje były łatwo dostępne z handlowego źródła.

Zalecane chemiczne substancje odniesienia przedstawiono w tabeli 1. Badania przy użyciu proponowanych chemicznych substancji odniesienia powinny być oceniane w nośniku, z którym są wymienione w tabeli 1. W sytuacjach, w których wymieniona w wykazie substancja nie jest dostępna, można stosować inne substancje spełniające kryteria doboru, z odpowiednim uzasadnieniem.

▼M3

Tabela 1

Zalecane w normie efektywności LLNA chemiczne substancje odniesienia

Numer	Substancje chemiczne (1)	Nr CAS	Forma	Nośnik (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x - 2,0x EC3	Rzeczywisty zakres EC3	LLNA w porównaniu z badaniami na świnkach morskich	LLNA w porównaniu z badaniami na ludziach
1	5-chloro-2-metylo-4-izotiazolino-3-on (CMI)/2-metylo-4-izotiazolino-3-on (MI) (5)	26172-55-4/ 2682-20-4	Ciecz	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Stała	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,094	+/+	+/+
3	4-fenylenodiamina	106-50-3	Stała	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	Chlorek kobaltu	7646-79-9	Stała	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	Izoeugenol	97-54-1	Ciecz	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Stała	DMF	1,7	1	0,85–3,4	NC	+/+	+/+
7	Cytral	5392-40-5	Ciecz	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Ciecz	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Ciecz	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	Benzoesan fenylu	93-99-2	Stała	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	Alkohol cynamonowy	104-54-1	Stała	AOO	21	1	10,5–42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidynylomocznik	39236-46-9	Stała	DMF	24	1	12–48	NC	+/+	+/+
13	Metakrylan metylu	80-62-6	Ciecz	AOO	90	1	45–100	NC	+/+	+/+
14	Chlorobenzen	108-90-7	Ciecz	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Alkohol izopropylowy	67-63-0	Ciecz	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Numer	Substancje chemiczne (1)	Nr CAS	Forma	Nośnik (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x - 2,0x EC3	Rzeczywisty zakres EC3	LLNA w porównaniu z badaniami na świnkach morskich	LLNA w porównaniu z badaniami na ludziach
16	Kwas mlekowy	50-21-5	Ciecz	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Salicylan metylu	119-36-8	Ciecz	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Kwas salicylowy	69-72-7	Stała	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Nieobowiązkowe substancje, które mają wykazać poprawę wyników w odniesieniu do LLNA										
19	Sól sodowa siarczanu dodecylu	151-21-3	Stała	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/–	+/–
20	Dimetakrylan glikolu etylenowego	97-90-5	Ciecz	MEK	28	1	14–56	NC	+/–	+/+
21	Ksylen	1330-20-7	Ciecz	AOO	95,8	1	47,9–100	NC	+/ (**)	+/–
22	Chlorek niklu	7718-54-9	Stała	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Skróty: AOO = aceton: oliwa z oliwek (w proporcji objętościowej 4: 1 v/v); nr CAS = Numer w Chemical Abstracts Service = Serwisie Dokumentacji Chemicznej; DMF = N, N-dimetyloformamid; DMSO = sulfotlenek dimetylowy; DNCB = 2,4-chlorodinitrobenzen; EC 3 = szacowane stężenie konieczne do wyprodukowania wskaźnika stymulacji 3; GP = wynik testów na świnkach morskich (tj. B. 6 lub wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań) (13); HCA = aldehyd cynamonowy heksylu; Liq = ciecz; LLNA = wynik badania lokalnych węzłów chłonnych na myszach (tj. B. 42 lub wytyczna OECD nr 429 dotycząca badań) (1); MEK = keton metylo-etylowy; ND = nie dotyczy, ponieważ wskaźnik stymulacji < 3; NC = nieobliczone, ponieważ dane zostały uzyskane z jednego badania; SOL = stałe; veh = badany nośnik.

(*) Przypuszcza się, że u ludzi nie wywołuje uczulenia ze względu na fakt, że nie stwierdzono oznak klinicznych testu skórnego, nie jest on uwzględniony w teście skórnym plasterkowym z zestawem alergenów, a także nie stwierdzono przypadków działania uczulającego na człowieka.

(**) GP brak dostępnych danych.

(1) Substancje należy przygotowywać codziennie, chyba że dane dotyczące stabilności wykazują dopuszczalność składowania.

(2) Ze względu na potencjalny wpływ różnych nośników na efektywność LLNA należy zastosować zalecany dla każdej chemicznej substancji odniesienia nośnik (24) (32).

(3) Wartość średnia, w przypadku gdy była dostępna więcej niż jedna wartość EC3. W odniesieniu do negatywnych substancji (tj. o wskaźniku stymulacji < 3) podano najwyższe badane stężenie.

(4) Liczba badań LLNA, z których dane zostały uzyskane.

(5) Dostępny w handlu jako Kathon CG (nr CAS 55965-84-9), mieszanina CMI I MI w proporcji 3:1. Odpowiednie stężenia dla każdego składnika wahają się między 1,1 % a 1.25 % (CMI) oraz 0,3 % a 0,45 % (MI). Składniki nieaktywne to: sole magnezu (od 21,5 % do 24 %) i azotan miedzi (od 0,15 % do 0,17 %), natomiast pozostała postać użytkowa to 74 % – 77 % wody. Kathon CG jest łatwo dostępny w firmach Sigma-Aldrich i Rohm and Haas (obecnie Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Zdefiniowane normy wiarygodności i dokładności**

7. Dokładność podobnej lub zmodyfikowanej metody LLNA powinna być taka sama, jak określona w normie efektywności LLNA, ocenionej przy użyciu 18 podstawowych chemicznych substancji odniesienia, jakie powinny być stosowane, lub ją przewyższać. Zastosowanie nowej lub zmodyfikowanej metody powinno prowadzić do poprawnej klasyfikacji w oparciu o decyzję „tak/nie". Jednak nowa lub zmodyfikowana metoda może nie zaklasyfikować poprawnie wszystkich z podstawowych chemicznych substancji odniesienia, jakie powinny być stosowane. Jeżeli na przykład jeden z czynników słabo uczulających został nieprawidłowo zaklasyfikowany, uzasadnienie nieprawidłowej klasyfikacji i odpowiednie dodatkowe dane (np. wyniki testów, na podstawie których prawidłowo zaklasyfikowano inne substancje z fizycznymi, chemicznymi i uczulającymi właściwościami podobnymi do tych posiadanych przez nieprawidłowo zaklasyfikowaną chemiczną substancję odniesienia) mogłoby być uznane za świadczące o równoważnej efektywności. W takich okolicznościach status zatwierdzenia nowej lub zmodyfikowanej metody LLNA będzie oceniany na zasadzie jednostkowych przypadków.

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna

8. W celu określenia odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej nowa lub zmodyfikowana metoda LLNA powinna być oceniona przy wykorzystaniu substancji uczulającej, która jest dobrze scharakteryzowana w LLNA. Z tego względu normy efektywności LLNA opierają się na zmienności wyników z powtórzonych badań aldehydu cynamonowego heksylu (HCA). Aby ocenić wiarygodność wewnątrzlaboratoryjną, należy wyprowadzić oszacowane wartości progowe stężenia dla HCA cztery razy, w co najmniej jednotygodniowych odstępach czasu. Potwierdzeniem dopuszczalnej wewnątrzlaboratoryjnej odtwarzalności jest zdolność laboratorium do uzyskania, w każdym badaniu HCA, oszacowanych wartości progowych dla HCA między 5 % i 20 %, tj. o zakresie 0,5–2,0 razy średnia EC3 określona dla HCA (10 %) w LLNA (zob. tabela 1).

Odtwarzalność międzylaboratoryjna

9. Odtwarzalność międzylaboratoryjna nowej lub zmodyfikowanej metody LLNA powinna być oceniona przy użyciu dwóch substancji uczulających, które są dobrze scharakteryzowane w LLNA. Normy efektywności LLNA opierają się na zmienności wyników z badań HCA i 2,4-chlorodinitrobenzenu (DNCB) w różnych laboratoriach. Oszacowane wartości progowe stężenia powinny być ustalane niezależnie, w wyniku pojedynczego badania przeprowadzonego przynajmniej w trzech różnych laboratoriach. Aby wykazać dopuszczalną odtwarzalność międzylaboratoryjną, każde laboratorium powinno uzyskać oszacowane wartości progowe stężenia wielkości od 5 % do 20 % dla HCA i od 0,025 % do 0,1 % dla DNCB, tj. o zakresie 0,5–2,0 razy średnia EC3 stężeń określonych dla HCA (10 %) i DNCB (0,05 %), odpowiednio, w LLNA (zob. tabela 1).

▼M3

Dodatek 2

Definicje

Dokładność: bliskość zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badania (14).

Substancja wzorcowa: uczulająca lub nieuczulająca substancja wykorzystywana jako norma dla celów porównania z substancją badaną. Substancja wzorcowa powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji; (iii) znane właściwości fizykochemiczne; (iv) dane potwierdzające występowanie znanych skutków; oraz (v) znany potencjał w zakresie pożądanych reakcji.

Oszacowany próg stężenia (ECt): oszacowane stężenie substancji badanej, niezbędne do wyprodukowania wskaźnika stymulacji, który jest oznaką pozytywnej reakcji.

Oszacowane stężenie 3 (EC3): oszacowane stężenie substancji badanej, niezbędne do wyprodukowania wskaźnika stymulacji o wartości 3.

Fałszywy wynik negatywny: substancja badana w wyniku zastosowania metody badania oznaczona niewłaściwie jako negatywna lub nieaktywna, podczas gdy w rzeczywistości jest pozytywna lub aktywna.

Fałszywy wynik pozytywny: substancja badana w wyniku zastosowania metody badania oznaczona niewłaściwie jako pozytywna lub aktywna, podczas gdy w rzeczywistości jest negatywna lub nieaktywna.

Zagrożenie: możliwość wywierania negatywnego wpływu na zdrowie lub środowisko. Niekorzystny wpływ przejawia się tylko wtedy, gdy istnieje wystarczające narażenie.

Odtwarzalność międzylaboratoryjna: miernik zakresu, w jakim różne wykwalifikowane laboratoria, przy użyciu tego samego protokołu i testując tę samą badaną substancję, mogą przynieść jakościowo i ilościowo podobne wyniki. Odtwarzalność międzylaboratoryjna jest określana w procesach poprzedzających walidację i obejmujących walidację i wskazuje, w jakim stopniu badanie można z powodzeniem przekazywać między laboratoriami: nazywana jest również odtwarzalnością międzylaboratoryjną (14).

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna: ustalenie stopnia, w jakim wykwalifikowani pracownicy w tym samym laboratorium mogą z powodzeniem odtworzyć wyniki, stosując szczegółowy protokół w różnych momentach. Nazywana również odtwarzalnością laboratoryjną (14).

Badanie me-too: potoczne określenie metody badania, która jest strukturalnie i funkcjonalnie podobna do zwalidowanych i zaakceptowanych zgodnie z referencyjną metodą badania. Taka metoda badania kwalifikowałaby się do wykorzystania jako walidacja „doganiająca". Zamiennie wykorzystana z podobną metodą badania (14).

Wynik odstający: wynik odstający jest obserwacją, która znacznie różni się od innych wartości w losowej próbce z populacji.

Normy efektywności (PS): normy oparte na zwalidowanej metodzie badania, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badania, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: (i) istotne elementy metody badania; (ii) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia, wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania akceptowalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz (iii) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zatwierdzonej metody badania, który proponowana metoda badania powinna osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem minimalnego wykazu chemicznych substancji odniesienia (14).

Zastrzeżona metoda badawcza: metoda badania, której produkcja i dystrybucja jest ograniczona poprzez patenty, prawa autorskie, znaki towarowe itp.

▼**M3**

Zapewnienie jakości: proces zarządzania, w którym przestrzeganie norm i wymogów w zakresie badań laboratoryjnych, oraz procedur dotyczących dokumentacji i dokładności przekazywania danych jest oceniane przez osoby niezależne od tych, które przeprowadzają badania.

Chemiczne substancje odniesienia: substancje chemiczne wybrane do wykorzystania w procesie walidacji, dla których reakcje w systemie badań referencyjnych *in vitro*, jak i *in vivo* lub odpowiednie dla badań gatunki są już znane. Te substancje powinny być reprezentatywne dla klas substancji chemicznych, w odniesieniu do których – zgodnie z oczekiwaniami – będzie stosowana dana metoda badawcza i powinny reprezentować pełny zakres reakcji, jakich można się spodziewać po substancjach chemicznych, w odniesieniu do których środek może być stosowany, od reakcji silnych przez słabe aż do negatywnych. Różne zestawy chemicznych substancji odniesienia mogą być wymagane na różnych etapach procesu zatwierdzania, a także w odniesieniu do różnych metod badawczych i zastosowań badania (14).

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne dla konkretnego celu. Jest to zakres, w jakim badanie prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badania (14).

Wiarygodność: miernik zakresu, w jakim metoda badania może zostać wykonana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami w dłuższym okresie czasu, w przypadku jej wykonywania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej (14).

Działanie uczulające na skórę: proces immunologiczny, do którego dochodzi w przypadku, gdy osobnik wrażliwy jest narażony miejscowo na wywołujący uczulenie chemiczny alergen, powodujący immunologiczną reakcję skórną, co może prowadzić do uczulania przez kontakt ze skórą.

Wskaźnik stymulacji (SI): wartość obliczona dla oceny potencjalnego działania uczulającego na skórę przez substancję badaną, który wyraża się stosunkiem proliferacji w grupach poddanych działaniu środka do proliferacji w równoległej grupie kontrolnej nośnika.

Substancja badana (określana także jako badana substancja chemiczna): każda substancja lub mieszanina, badana za pomocą niniejszej TM.

Zwalidowana metoda badania: metoda badania, w odniesieniu do której zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zwalidowana metoda badania może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu (14).

▼B

B.43. **BADANIE NEUROTOKSYCZNOŚCI U GRYZONI**

1. **METODA**

Ta metoda badania jest odpowiednikiem TG 424 (1997).

Ta metoda badania została zaprojektowana w celu uzyskania danych potrzebnych do potwierdzenia lub bliższego scharakteryzowania potencjalnej neurotoksyczności związków chemicznych względem dorosłych zwierząt. Można ją albo łączyć z istniejącymi metodami testowania wielokrotnej dawki, albo wykorzystywać w odrębnym badaniu. W celu uzyskania pomocy w projektowaniu badań opartych na tej metodzie zaleca się zapoznanie się z dokumentem zawierającym wytyczne OECD dotyczące strategii i metod badania neurotoksyczności (1). Jest to szczególnie ważne, jeżeli rozważa się modyfikacje obserwacji i procedur badania zalecanych do rutynowego wykorzystania tej metody. Dokument zawierający wytyczne przygotowano w celu ułatwienia wyboru innych procedur testowych do wykorzystywania w konkretnych okolicznościach.

Ocena neurotoksyczności rozwojowej nie jest tematem omawianej metody.

1.1. WPROWADZENIE

W ocenie i ewaluacji charakterystyki toksycznej substancji chemicznych ważne jest rozparzenie potencjału wywoływania skutków neurotoksycznych. Już metoda testowania ogólnoustrojowej toksyczności dawki wielokrotnej zawiera obserwacje, które mogą być badaniami sortującymi pod kątem potencjalnej neurotoksyczności. Omawiana metoda testowa może być wykorzystana do zaprojektowania badania zmierzającego do uzyskania bliższej informacji lub potwierdzenia skutków neurotoksycznych obserwowanych w badaniach ogólnoustrojowej toksyczności dawki wielokrotnej. Jednakże rozpatrywanie potencjalnej neurotoksyczności pewnych klas związków chemicznych może wskazywać, że może być ona właściwiej oceniona za pomocą omawianej metody, bez wcześniejszego wskazania potencjalnej neurotoksyczności w badaniu ogólnoustrojowej toksyczności dawki wielokrotnej. Tego rodzaju ewentualne wskazania obejmują na przykład:

— obserwacje oznak neurologicznych lub zmian neuropatologicznych w badaniach innych niż badania ogólnoustrojowej toksyczności dawki wielokrotnej, lub

— strukturalna zależność lub inne informacje wiążące je ze znanymi substancjami neurotoksycznymi.

Ponadto mogą być jeszcze inne przypadki, kiedy wykorzystanie omawianej metody jest właściwe; w celu uzyskania dodatkowych szczegółów, zob. (1).

Ta metoda została opracowana w taki sposób, że można ją dostosować do konkretnych potrzeb potwierdzenia specyficznej neurotoksyczności histopatologicznej i behawioralnej związku chemicznego, jak również charakteryzowania i ilościowego określania reakcji neurotoksycznej.

▼B

W przeszłości utożsamiano neurotoksyczność z neuropatią obejmującą zmiany neuropatologiczne lub dysfunkcje neurologiczne, takie jak napady, paraliż lub drżenie. Chociaż neuropatia jest ważnym objawem klinicznym neurotoksyczności, w tej chwili wiadomo już, że jest wiele innych oznak toksyczności względem układu nerwowego (np. utrata koordynacji motorycznej, niedobory czucia, dysfunkcje uczenia się i pamięci), które mogą nie ujawniać się w badaniach neuropath i innych typach badań.

Omawiana metoda badania neurotoksyczności zaprojektowana została w celu wykrywania głównych skutków neurobehawioralnych i neuropatologicznych u dorosłych gryzoni. Chociaż skutki behawioralne, nawet przy braku zmian morfologicznych mogą odzwierciedlać niekorzystny wpływ na organizm, nie wszystkie zmiany behawioralne są specyficzne dla systemu nerwowego. A zatem wszelkie obserwowane zmiany należy interpretować w powiązaniu z korelacyjnymi danymi histopatologicznymi, hematologicznymi lub biochemicznymi jak również danymi dotyczącymi innych rodzajów toksyczności ogólnoustrojowej. Testowanie potrzebne w tej metodzie do scharakteryzowania i ilościowego określenia reakcji neurotoksycznych obejmuje specyficzne procedury histopatologiczne i behawioralne, które mogą być dalej potwierdzone przez badania elektrofizjologiczne i/lub biochemiczne (1)(2)(3)(4).

Czynniki neurotoksyczne mogą oddziaływać na wiele celów w obrębie układu nerwowego i to za pośrednictwem różnych mechanizmów. Ponieważ nie ma jednego zestawu testów, który potrafiłby dokładni ocenić potencjał neurotoksyczny wszelkich substancji, może być konieczne wykorzystywanie innych testów *in vivo* lub *in vitro* specyficznych względem obserwowanego lub przewidywanego rodzaju neurotoksyczności.

Niniejsza metoda badania może być również wykorzystana w połączeniu z wytycznymi podanymi w dokumencie OECD dotyczącym strategii i metod badania neurotoksyczności (1) do zaprojektowania badań zmierzających do bliższego scharakteryzowania lub zwiększenia czułości ilościowego określania reakcji na dawkę, albo lepszej oceny poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się niekorzystnych skutków lub potwierdzenia znanych, lub podejrzewanych zagrożeń związanych z danym związkiem chemicznym. Na przykład można zaprojektować badania zmierzające do zidentyfikowania i oceny mechanizmu(-ów) neurotoksycznych lub uzupełnienia danych dostępnych w ramach wykorzystania podstawowych procedur obserwacji neurobehawioralnych i neuropatologicznych. Badania takie nie muszą dublować danych, które można by uzyskać przez zastosowanie standardowych procedur zalecanych w niniejszej metodzie, jeżeli takie dane sąjuż dostępne albo nie zostały uznane za konieczne do interpretacji wyników tego badania.

Badanie neurotoksyczności, wykorzystywane odrębnie albo w połączeniu z innymi, dostarcza informacji, które mogą:

— stwierdzić, czy testowany związek chemiczny wpłynął na układ nerwowy w sposób trwały czy odwracalny,

— przyczynić się do scharakteryzowania zmian w układzie nerwowym związanych z ekspozycją na związek chemiczny, oraz do zrozumienia mechanizmu leżącego u podłoża jego oddziaływania,

▼B

— określić zależności reakcji od dawki i czasu, w celu ocenienia poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się niekorzystnych skutków (który można wykorzystać do ustalenia kryteriów bezpieczeństwa w odniesieniu do danego związku chemicznego).

Omawiana metoda testowa wykorzystuje doustną drogę podawania testowanej substancji. Inne drogi podawania (np. naskórna lub wziewna) mogą być właściwsze i mogą wymagać modyfikacji zalecanych procedur. Wybór drogi podawania zależy od profilu narażenia ludzi oraz dostępnych informacji w zakresie toksykologii i kinetyki.

1.2. DEFINICJE

Niekorzystny skutek: jakakolwiek mająca związek z terapią zmiana w stosunku do danych bazowych, która zmniejsza zdolność organizmu do przeżycia, rozmnażania lub przystosowania się do środowiska.

Dawka: jest ilością podawanej substancji testowej. Dawka wyrażana jest w jednostkach wagowych (g, mg) lub jako waga substancji testowej na jednostkę masy badanego zwierzęcia (np. mg/Kg), lub jako stałe stężenie pożywienia (ppm).

Dawkowanie: jest terminem ogólnym obejmującym dawkę, częstotliwość i czas trwania dawkowania.

Neurotoksyczność: jest niekorzystną zmianą struktury lub funkcji układu nerwowego wynikającą z ekspozycji na czynnik chemiczny, biologiczny lub fizyczny.

Czynnik neurotoksyczny: to jakikolwiek czynnik chemiczny, biologiczny lub fizyczny o potencjale powodowania skutków neurotoksycznych.

NOAEL: jest skrótem oznaczającym poziom, przy którym nie obserwuje się niekorzystnych skutków i jest najwyższą dawką lub poziomem ekspozycji, przy zastosowaniu którego nie obserwuje się niekorzystnych wyników terapii.

1.3. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Testowany związek chemiczny podawany jest drogą doustną, w postaci pewnego zakresu dawek, kilku grupom gryzoni laboratoryjnych. Wymagane są zazwyczaj dawki wielokrotne, zaś reżim dawkowania może obejmować 28 dni, podchronicznej (90 dni) lub chronicznej toksyczności (1 rok lub dłużej). Procedury opisane w niniejszej metodzie badawczej mogą być również użyte w badaniu neurotoksyczności ostrej. Zwierzęta bada się w celu wykrycia lub scharakteryzowania behawioralnych i/lub neurologicznych nieprawidłowości. Zakres zachowań, na które czynniki neurotoksyczne mogą wpływać, oceniany jest w każdym okresie obserwacji. Na koniec badania podgrupę zwierząt każdej z płci poddaje się perfuzji *in situ,* a następnie preparuje i bada skrawki mózgu, rdzenia kręgowego i nerwów obwodowych.

Jeżeli badanie przeprowadza się jako odrębne badanie w celu sortowania pod kątem neurotoksyczności lub scharakteryzowania efektów neurotoksycznych, zwierzęta z każdej grupy, nieużyte do perfuzji i następczego badania histopatologicznego (zob. tabela 1), mogą zostać wykorzystane do konkretnych procedur neurobehawioralnych, neuropatologicznych i elektrofizjologicznych, które mogą uzupełnić dana otrzymane w standardowych badaniach wymaganych w niniejszej metodzie (1). Tego rodzaju dodatkowe procedury mogą być szczególnie użyteczne w przypadkach kiedy obserwacje empiryczne lub przewidywane skutki wskazują na jakiś szczególny rodzaj lub docelowy organ działania neurotoksycznego. Alternatywnie, pozostałe zwierzęta mogą zostać wykorzystane do ocen, jakich wymaga metoda badania toksyczności dawki wielokrotnej u gryzoni.

▼B

Jeżeli procedury powyższej metody badania łączone są z objętymi innymi metodami, należy użyć wystarczającej liczby zwierząt potrzebnej do osiągnięcia celów obu badań.

1.4. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.4.1. **Wybór gatunków zwierząt**

Szczur jest pożądanym gatunkiem zwierzęcia do badań, chociaż można użyć innego gatunku gryzonia, z podaniem uzasadnienia. Należy prowadzić badania na młodych dorosłych, zdrowych osobnikach powszechnie używanych szczepów laboratoryjnych. Samice powinny być nieciężarne i takie, które nie rodziły. Dawkowanie powinno się zazwyczaj zacząć najszybciej jak to możliwe po zakończeniu ssania, najlepiej nie później niż w wieku sześciu tygodni, w każdym razie zanim zwierzęta osiągną wiek dziewięciu tygodni. Jednakże jeżeli badanie łączone jest z innym badaniem, wymagania co do wieku mogą wymagać zmodyfikowania. Na początku badania zmienność ciężaru zwierząt powinna być minimalna i nie przekraczać ± 20 % średniego ciężaru dla każdej płci. Kiedy przeprowadza się krótkotrwałe badanie z zastosowaniem dawki wielokrotnej jako wstępne badanie do badania długoterminowego, w obu badaniach należy użyć zwierząt tego samego szczepu pochodzących z tego samego źródła.

1.4.2. **Warunki przebywania i warunki żywieniowe**

Temperatura w badawczych pomieszczeniach hodowlanych powinna wynosić 22 ^{o}C (± 3 ^{o}C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin jasno, 12 godzin ciemno. Należy zminimalizować sporadyczne głośne hałasy. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Na wybór diety może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej domieszki substancji testowanej przy podawaniu metodą powyższą. Zwierzęta mogą być trzymane pojedynczo lub umieszczane w klatkach w małych grupach o tej samej płci.

1.4.3. **Przygotowanie zwierząt**

Zdrowe, młode zwierzęta są losowo przydzielane do grup badanych i kontrolnych. Klatki powinny być ustawione w taki sposób, żeby zminimalizować możliwy wpływ położenia klatki. Zwierzęta są identyfikowane jednoznacznie i przetrzymywane w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem badania, żeby umożliwić aklimatyzację do warunków laboratoryjnych.

1.4.4. **Droga podawania i przygotowanie dawek**

Ta metoda dotyczy konkretnie podawania doustnego substancji testowej. Podawanie może odbywać się przez rurkę, w pożywieniu, wodzie pitnej lub w kapsułkach. Można użyć innych dróg podawania (np. naskórnej lub wziewnej), ale może to wymagać modyfikacji zalecanych procedur. Wybór drogi podawania zależy od profilu narażenia ludzi oraz dostępnych informacji w zakresie toksykologii i kinetyki. Należy wskazać racjonalne uzasadnienie wyboru drogi podawania, jak również wynikające z niego modyfikacje procedury tej metody testowej.

▼B

W przypadku gdy to konieczne, substancja testowana jest rozpuszczona lub ma postać zawiesiny w odpowiednim nośniku. Zaleca się, aby – jeżeli to możliwe – najpierw było rozważone użycie wodnego roztworu/zawiesiny, następnie roztworu/emulsji w oleju (np. olej kukurydziany), a potem możliwy roztwór w innym nośniku. Musi być znana charakterystyka toksyczna nośnika. Ponadto należy uwzględnić następujące charakterystyki nośnika lub innych domieszek: skutek wywierany na absorpcję, dystrybucję, metabolizm, oraz na zatrzymywanie lub ekskrecję substancji testowej; skutki wywierane na chemiczne własności substancji testowej, które mogą zmienić jej charakterystykę toksyczną; należy również uwzględnić wpływ na pobieranie pokarmu lub wody, lub stan odżywienia zwierząt.

1.5. PROCEDURY

1.5.1. **Liczba i płeć zwierząt**

Kiedy badanie prowadzone jest jako odrębne, do oceny szczegółowych obserwacji klinicznych należy użyć co najmniej 20 zwierząt (10 samców i 10 samic) w każdej z grup dawkowania i kontrolnej. Co najmniej pięć samców i pięć samic należy poddać perfuzji *in situ* i wykorzystać do szczegółowych badań neurohistopatologicznych na zakończenie badania. W przypadkach kiedy obserwacje kliniczne pod kątem oznak skutków neurotoksycznych prowadzone są tylko w odniesieniu do ograniczonej liczby zwierząt, należy rozważyć włączenie tych zwierząt do grupy wybranych do perfuzji. Jeżeli badanie prowadzone jest w połączeniu z badaniem toksyczności dawki wielokrotnej, należy użyć odpowiedniej liczby zwierząt potrzebnej do osiągnięcia celów obu badań. Minimalne liczby zwierząt dla różnych kombinacji badań podano w tabeli 1. Jeżeli planowane jest uśmiercanie w czasie trwania badania lub rozważa się prowadzenie grup zwierząt zdrowiejących w celu obserwacji odwracalności, utrzymywania się lub opóźnionych skutków toksycznych, lub rozważa się obserwacje uzupełniające, wtedy należy zwiększyć liczbę zwierząt aby zapewnić, że wystarczy ich do celów obserwacji i badań histopatologicznych.

1.5.2. **Grupy badane i grupa kontrolna**

Zasadniczo, powinny być wykorzystane co najmniej trzy grupy badane i grupa kontrolna, jednak jeżeli z oceny innych danych należałoby oczekiwać braku objawów przy dawce 1 000 mg/kg masy ciała/dzień, może być przeprowadzony test graniczny. Jeżeli nie są dostępne odpowiednie dane, może być wykonane badanie wyników zakresowych, pomagające w określeniu dawek, które mają być użyte. Z wyjątkiem zastosowania substancji testowanej, ze zwierzętami grupy kontrolnej powinno się obchodzić w sposób identyczny, jak z podmiotami grupy badanej. Jeżeli przy podawaniu substancji testowanej jest stosowany nośnik, grupa kontrolna powinna otrzymać największą użytą objętość nośnika. Z wyjątkiem zastosowania substancji testowanej, ze zwierzętami grup kontrolnych powinno się obchodzić w sposób identyczny, jak ze zwierzętami grup badanych. Jeżeli przy podawaniu substancji testowanej jest stosowany nośnik, grupa kontrolna powinna otrzymać największą użytą objętość nośnika.

1.5.3. **Sprawdzenie niezawodności**

Laboratorium wykonujące badanie powinno przedstawić dane wykazujące jego zdolność do przeprowadzenia badania oraz czułość używanych metod. Dane te powinny udowadniać zdolność do wykrywania i ilościowego określania stosownych zmian w punktach końcowych zalecanych do obserwacji, takich jak objawy autonomiczne, reaktywność czuciowa, siła uchwytu i aktywność motoryczna. Informacje o związkach chemicznych, które powodują różne rodzaje reakcji neurotoksycznych i mogą zostać użyte jako substancje do kontroli pozytywnej można znaleźć w pozycjach bibliograficznych (2)–(9). Mogą zostać użyte wcześniej uzyskane dane jeżeli istotne aspekty procedury pozostają takie same. Zalecane jest okresowe uaktualnianie przeszłych danych. Należy uzyskać nowe dane wykazujące zachowaną czułość procedur w przypadku gdy jakiś istotny element w przebiegu badania lub procedurach został zmieniony przez laboratorium wykonujące.

▼B

1.5.4 **Wybór dawki**

Poziomy dawki powinny być wybierane poprzez wzięcie pod uwagę jakichkolwiek istniejących danych o toksyczności i danych kinetycznych osiągalnych dla substancji testowanej lub materiałów pokrewnych. Powinien zostać wybrany najwyższy poziom dawki, w celu wywołania skutków neurotoksycznych lub wyraźnych toksycznych skutków ogólnoustrojowych. Od tego czasu malejąca sekwencja poziomów dawki powinna być dobierana w taki sposób, aby wykazać wszelkie reakcje powiązane z dawkowaniem i brak obserwowanych objawów niekorzystnych przy najmniejszym poziomie dawki (NOAEL). W zasadzie poziomy dawek powinny być tak dobrane, aby pierwotne skutki działania toksycznego na układ nerwowy dały się odróżnić od skutków odnoszących się do toksyczności ogólnoustrojowej. Dwa do trzech interwałów są często optymalne dla ustalenia malejących poziomów dawki i dodanie czwartej grupy badanej jest często bardziej pożądane niż stosowanie bardzo dużych interwałów (np. współczynnik większy od 10) między dawkowaniem. Tam, gdzie dostępna jest racjonalna ocena ekspozycji ludzi, powinna być ona również wzięta pod uwagę.

1.5.5. **Test graniczny**

Jeżeli test przy jednym poziomie dawki równym co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała/dzień, przy stosowaniu procedur opisanych dla tego badania, nie wywołuje widocznych objawów neurotoksycznych i jeżeli nie należałoby spodziewać się toksyczności na podstawie danych dotyczących substancji strukturalnie pokrewnych, wtedy pełne badanie przy użyciu trzech poziomów dawki może nie być konieczne. Ten test graniczny stosuje się z wyjątkiem przypadków, w których ekspozycja ludzi może wskazać na konieczność zastosowania w teście granicznym wyższego poziomu dawki doustnej. W odniesieniu do innych dróg podawania, na przykład wziewnej lub stosowania na skórę, własności fizyczne substancji testowanej mogą często wyznaczać najwyższy możliwy do osiągnięcia poziom ekspozycji. Dawka testu granicznego do przeprowadzenia badania doustnej toksyczności ostrej powinna wynosić co najmniej 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Podawanie dawek**

Zwierzętom podaje się dawki substancji testowej raz dziennie, przez siedem dni w tygodniu, przez okres co najmniej 28 dni; stosowanie podawania przez pięć dni lub przez krótszy okres ekspozycji wymaga uzasadnienia. Kiedy substancja testowana podawana jest wprost do żołądka, powinna być podawana w jednorazowej dawce przy użyciu rurki lub odpowiedniej kaniuli dotchawicznej. Maksymalna objętość cieczy, która może być podana jednorazowo, zależy od wielkości badanych zwierząt. Objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała; jednakże w przypadku roztworów wodnych można rozważyć użycie do 2 ml/100 g masy ciała. Poza substancjami drażniącymi i korozyjnymi, które normalnie ujawniają zaostrzone objawy przy wyższych stężeniach, zmienność objętości w teście powinna być zminimalizowana przez dostosowanie stężenia, tak aby zapewnić stałą objętość dla wszystkich poziomów dawki.

W przypadku substancji podawanych w pożywieniu lub wodzie pitnej ważne jest zapewnienie, aby wymagane ilości substancji testowanej nie kolidowały z prawidłową równowagą odżywiania lub wody. W przypadku gdy substancja testowana jest podawana w pożywieniu, może być stosowane stałe stężenie żywieniowe (ppm) albo stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierząt; użyta opcja musi być wyszczególniona. W przypadku substancji podawanej bezpośrednio do żołądka dawka powinna być podawana każdego dnia o podobnym czasie, i w razie konieczności modyfikowana, żeby utrzymać stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia. W przypadku gdy badanie wielokrotnej dawki jest przeprowadzane jako badanie wstępne do badania długoterminowego, w obu badaniach powinna być stosowana podobna dieta. W badaniach toksyczności ostrej, jeżeli pojedyncza dawka nie jest możliwa, może ona być podawana w mniejszych częściach przez okres nieprzekraczający 24 godzin.

▼B

1.6. OBSERWACJE

1.6.1. **Częstotliwość obserwacji i badań**

W badaniach dawki wielokrotnej okres obserwacji obejmuje okres dawkowania, w badaniach toksyczności ostrej, należy przestrzegać 14-dniowego okresu poobserwacyjnego. U zwierząt w grupie satelitarnej, którą trzyma się bez ekspozycji w okresie po terapii, obserwacje powinny objąć również i ten okres.

Obserwacje należy prowadzić z wystarczającą częstotliwością by zmaksymalizować prawdopodobieństwo wykrycia nieprawidłowości w zachowaniu i/lub nieprawidłowości neurologicznych. Obserwacje powinny być przeprowadzane najlepiej każdego dnia o tej samej porze, biorąc pod uwagę szczytowy okres przewidywanych objawów po dawkowaniu. Częstotliwość obserwacji klinicznych i funkcjonalnych zestawiono w tabeli 2. Jeżeli dane kinetyczne, lub inne dane pochodzące z poprzednich badań wskazują na potrzebę wyznaczenia innych punktów czasowych, badań lub okresów poobserwacyjnych, w celu otrzymania jak największej ilości informacji, można przyjąć odmienny harmonogram. Należy przedstawić racjonalne powody zmian w harmonogramie.

1.6.1.1. *Obserwacje ogólnego stanu zdrowia oraz zachorowalności/śmiertelności*

Należy uważnie obserwować wszystkie zwierzęta, co najmniej raz dziennie, pod kątem ogólnego stanu zdrowia, jak również co najmniej dwa razy dziennie, pod kątem zachorowalności i śmiertelności.

1.6.1.2. *Szczegółowe obserwacje kliniczne*

Należy prowadzić szczegółowe obserwacje kliniczne wszystkich zwierząt wybranych do tego celu (zob. tabela 1), jeden raz przed pierwszą ekspozycją (aby uwzględnić porównanie w obrębie podmiotów), i od tego czasu w różnych odstępach czasu, w zależności od czasu trwania badania (zob. tabela 2). Szczegółowe obserwacje kliniczne w satelitarnych grupach zdrowiejących zwierząt powinny zostać przeprowadzone pod koniec okresu zdrowienia. Szczegółowe obserwacje kliniczne powinny być przeprowadzane na zewnątrz klatki macierzystej na znormalizowanej powierzchni. Powinny być one dokładnie odnotowywane przy użyciu systemów punktowania zawierających kryteria lub skale punktowe dla każdego pomiaru w obserwacjach. Kryteria zastosowanych skal powinny być wyraźnie zdefiniowane przez laboratorium testujące. Należy podjąć wysiłki, aby zagwarantować, że zmiany warunków badania są minimalne (niepowiązane systematycznie z terapią) oraz że obserwacje są przeprowadzane najlepiej przez obserwatorów nieświadomych rzeczywiście zastosowanej terapii.

Zaleca się prowadzenie obserwacji w sposób ustrukturalizowany, w którym dokładnie zdefiniowane kryteria (w tym definicja normalnego „zakresu”) stosowane są systematycznie do każdego zwierzęcia w każdym okresie obserwacji. Należy dostatecznie udokumentować „normalny zakres”. Wszelkie zaobserwowane objawy powinny być odnotowywane. Gdzie to możliwe, należy również odnotować wielkość obserwowanych objawów. Obserwacje kliniczne powinny obejmować, ale nie powinny być do nich ograniczone, zmiany w skórze, futrze, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin i wydalin oraz aktywność wegetatywną (np. łzawienie, podniesienie sierści, rozmiar źrenicy, niezwykła forma oddychania i/lub oddychanie przez jamę ustną, wszelkie niezwykłe oznaki oddawania moczu lub defekacji oraz odbarwiony mocz).

▼B

Należy również odnotowywać wszelkie niezwykłe reakcje w odniesieniu do postawy, poziomu aktywności (np. podwyższenie lub obniżenie poziomu eksploracji znormalizowanej powierzchni) i koordynacji ruchowej. Należy także odnotowywać zmiany w sposobie chodzenia (np. chód kaczkowaty, ataksja), postawie (np. wygięty grzbiet), i reakcji na dotyk, przenoszenie i inne bodźce ze środowiska, jak również obecność ruchów drgawkowych lub kurczowych, konwulsji lub drżenia, stereotypy (np. nadmierne czyszczenie się, niezwykłe ruchy głową, powtarzające się krążenie w kółko), lub dziwne zachowania (np. gryzienie lub nadmierne wylizywanie, samookaleczanie, chodzenie do tyłu, wydawanie dźwięków) lub agresję.

1.6.1.3. *Obserwacje funkcjonalne*

Podobnie jak szczegółowe obserwacje kliniczne, obserwacje funkcjonalne należy również przeprowadzić raz przed ekspozycją i później, często, u wszystkich zwierząt wybranych w tym celu (zob. tabela 1). Częstotliwość obserwacji funkcjonalnych zależy również od czasu trwania badania (zob. tabela 2). Dodatkowo, oprócz obserwacji podanych w tabeli 2, należy również przeprowadzić obserwacje funkcjonalne satelitarnej grupy zwierząt zdrowiejących, jak najbliżej terminu końcowego uśmiercenia. Badania funkcjonalne powinny obejmować reaktywność na bodźce różnego typu (np. słuchowe, wzrokowe i czucia głębokiego (5)(6)(7)), ocenę siły uchwytu (8) oraz ocenę aktywności motorycznej (9). Aktywność motoryczną należy mierzyć urządzeniem automatycznym umożliwiającym wykrywanie zarówno wzrostu jak i spadku aktywności. Jeżeli zastosowano inny zdefiniowany system, powinien on dokonywać pomiaru ilościowego, należy też wykazać jego niezawodność. Należy przetestować każde urządzenie, aby zapewnić niezawodność w czasie oraz spójność pomiędzy urządzeniami. Bliższe szczegóły procedur, które można przeprowadzać, podane są w odpowiednich pozycjach bibliografii. Jeżeli brak jest danych (np. struktura-działanie, dane epidemiologiczne, inne badania toksykologiczne) wskazujących potencjalne skutki neurotoksyczne, należy rozważyć włączenie bardziej specjalistycznych obserwacji funkcji sensorycznej, aktywności motorycznej i modelu zachowania lub uczenia się i pamięci, w celu bardziej szczegółowego zbadania tych potencjalnych skutków. Dalsze szczegóły bardziej wyspecjalizowanych obserwacji i ich zastosowania są podane w (1).

Wyjątkowo z obserwacji funkcjonalnych mogą być wyłączone zwierzęta, które ujawniają oznaki zatrucia w stopniu, który mógłby znacząco kolidować z wykonaniem obserwacji funkcjonalnej. Należy podać uzasadnienie wyłączenia zwierząt z obserwacji funkcjonalnej.

1.6.2. **Masa ciała i spożycie pożywienia/wody**

W badaniach trwających do 90 dni, wszystkie zwierzęta powinny być ważone co najmniej raz w tygodniu. Pomiary spożycia pożywienia (i wody, jeżeli substancja testowana podawana jest z wodą pitną) powinny być wykonywane co najmniej raz na tydzień. W badaniach długoterminowych należy ważyć zwierzęta raz na tydzień przez pierwsze 13 tygodni, później zaś co najmniej raz na 4 tygodnie. Należy dokonywać pomiarów spożycia pożywienia (i wody, jeżeli substancja testowana podawana jest w tym ośrodku) co najmniej raz na tydzień przez pierwsze 13 tygodni, a następnie w około trzymiesięcznych odstępach, jeżeli stan zdrowia lub zmiany wagi ciała wymuszą stosowanie innej procedury.

▼B

1.6.3. **Oftalmologia**

W przypadku badań trwających dłużej niż 28 dni badanie oftalmologiczne z wykorzystaniem oftalmoskopu lub podobnego sprzętu powinno zostać przeprowadzone przed podaniem substancji testowej oraz przed zakończeniem badań, najlepiej na wszystkich zwierzętach, ale co najmniej na zwierzętach grupy najwyższego dawkowania i grupy kontrolnej. W przypadku wykrycia zmian w oczach należy przebadać wszystkie zwierzęta. W badaniach długoterminowych należy przeprowadzić badanie oftalmologiczne również w 13 tygodniu. Nie ma potrzeby przeprowadzania badania oftalmologicznego, jeżeli takie dane są już dostępne z innych badań o podobnym okresie trwania i przy podobnych poziomach dawek.

1.6.4. **Hematologia i biochemia kliniczna**

Kiedy badanie neurotoksyczności prowadzone jest w połączeniu z badaniem ogólnoustrojowej toksyczności dawki wielokrotnej, należy przeprowadzić badania hematologiczne i oznaczenia w zakresie biochemii klinicznej według zasad podanych w odpowiedniej metodzie badania toksyczności ogólnoustrojowej. Próbki należy pobierać w taki sposób, żeby zminimalizować jakikolwiek potencjalny wpływ na zachowania o podłożu neurologicznym.

1.6.5. **Histopatologia**

Należy zaplanować badanie neuropatologiczne w celu uzupełnienia i poszerzenia obserwacji poczynionych podczas fazy *in vivo* badania. Tkanki pobrane od co najmniej 5 zwierząt/płeć/grupę (zob. tabela 1 i następny akapit) należy utrwalić *in situ*, stosując powszechnie przyjęte techniki perfuzji i utrwalania (zob. poz. bibliograficzna (3), rozdział 5, i poz. bibliograficzna (4), rozdział 50). Należy odnotować widoczne oglądowo zmiany. Jeżeli badanie jest przeprowadzane jako odrębne badanie sortujące pod kątem neurotoksyczności lub w celu scharakteryzowania skutków neurotoksycznych, można wykorzystać pozostałe zwierzęta do konkretnych procedur neurobehawioralnych (10)(11), neuropatologicznych (10)(11)(12)(13), neurochemicznych (10)(11)(14)(15) lub elektrofizjologcznych (10)(11)(16)(17), którymi można uzupełniać procedury i badania opisane powyżej; można też powiększyć o nie liczbę zwierząt badanych histopatologicznie. Tego rodzaju dodatkowe procedury są szczególnie użyteczne w przypadkach, kiedy obserwacje empiryczne lub przewidywane skutki wskazują na jakiś szczególny rodzaj lub docelowy organ działania neurotoksycznego (2)(3). Alternatywnie, można wykorzystać pozostałe zwierzęta również do rutynowych badań histopatologicznych, jakie opisano w metodzie badań dawki wielokrotnej.

Wszystkie preparaty tkanek zatopione w parafinie należy poddać ogólnej procedurze barwienia, jak np. hematoksyliną i eozyną (H&E), i zbadać pod mikroskopem. Jeżeli zaobserwuje się oznaki neuropatii obwodowej lub podejrzewa ich obecność, należy zbadać próbki tkanki nerwów obwodowych zatopione w tworzywie. Oznaki kliniczne mogą również sugerować dodatkowe lokalizacje do zbadania lub też zastosowanie specjalnych procedur barwienia. Wytyczne dotyczące dodatkowych miejsc do zbadania można znaleźć w (3)(4). Pomocne mogą być także właściwe specjalne barwniki ujawniające konkretne rodzaje zmian patologicznych (18).

▼B

Należy zbadać histologicznie reprezentatywne skrawki z centralnego i obwodowego układu nerwowego (zob. poz. bibliograficzna (3), rozdział 5, i poz. bibliograficzna (4), rozdział 50). Obszary badane powinny zwykle obejmować: przodomózgowie, centralną część móżdżku, w tym przekrój przez hipokamp, śródmózgowie, móżdżek, most, rdzeń przedłużony, oko z nerwem wzrokowym i siatkówką, rdzeń kręgowy na poziomie rozszerzenia szyjnego i lędźwiowego, zwoje korzeni grzbietowych, włókna korzeni brzusznych i grzbietowych, proksymalny nerw kulszowy, proksymalny nerw piszczelowy (w kolanie) oraz mięśniowe odgałęzienia nerwu piszczelowego. Skrawki z rdzenia kręgowego i nerwów obwodowych powinny obejmować zarówno przekroje poprzeczne jak i wzdłużne. Należy uwzględnić unaczynienie układu nerwowego. Należy również zbadać próbkę mięśnia szkieletowego, szczególnie mięśnia łydki. Szczególną uwagę należy poświęcić tym okolicom, których struktury komórkowe i włókna w centralnym i obwodowym układzie nerwowym znane są ze szczególnej podatności na działanie czynników neurotoksycznych.

W pozycjach bibliograficznych (3)(4) można znaleźć wskazówki dotyczące zmian neuropatologicznych typowych dla zmian wynikających z ekspozycji na czynnik toksyczny. Zaleca się dokonywanie badań w etapach, w których skrawki z grupy wysokiego dawkowania porównywane są najpierw ze skrawkami z grupy kontrolnej. Jeżeli nie zostaną zaobserwowane żadne zmiany neuropatologiczne w próbach z tych grup, nie jest wymagana dalsza analiza. Jeżeli zostaną zaobserwowane zmiany w grupie wysokiego dawkowania, próba każdej potencjalnie dotkniętej tkanki z grup pośredniego i niskiego dawkowania powinna zostać zakodowana i następnie zbadana sekwencyjnie.

Jeżeli w obserwacjach jakościowych zostaną zauważone dowody jakichkolwiek zmian neuropatologicznych, należy przeprowadzić badanie we wszystkich obszarach układu nerwowego wykazujących te zmiany. Skrawki z potencjalnie dotkniętych okolic, ze wszystkich grup dawkowania, należy zakodować i badać losowo bez znajomości kodu. Należy odnotować częstość i ciężkość każdej zmiany. Kiedy zostaną ocenione wszystkie grupy dawkowania, można rozkodować oznaczenia i przeprowadzić analizę statystyczną w celu oszacowania zależności reakcji od dawki. Należy opisać przykłady zmian o różnym stopniu ciężkości.

Zmiany neuropatologiczne powinny być oceniane w kontekście obserwacji i pomiarów, jak również innych danych z wcześniejszych lub jednocześnie prowadzonych badań toksyczności ogólnoustrojowej testowanej substancji.

2. **DANE**

2.1. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Powinny zostać dostarczone dane indywidualne zwierząt. Dodatkowo wszystkie dane powinny być podsumowane w formie tabeli przedstawiającej dla każdej grupy badanej lub kontrolnej liczbę zwierząt na początku testu, liczbę zwierząt, które znaleziono martwe podczas testu lub uśmiercono z powodów humanitarnych i czas każdej śmierci lub humanitarnego uśmiercenia, liczbę zwierząt wykazujących oznaki toksyczności, opis obserwowanych oznak zatrucia, w tym czas rozpoczęcia, okres trwania, rodzaj i ciężkość wszelkich skutków zatrucia, liczbę zwierząt wykazujących zmiany patologiczne, typ zmian(-y).

▼B

2.2. OCENA I INTERPRETACJA WYNIKÓW

Objawy stwierdzone w badaniu należy ocenić w kategoriach częstości występowania, ciężkości i korelacji skutków neurobehawioralnych i neuropatologicznych (również neurochemicznych i elektrofizjologicznych, jeżeli włączono dodatkowe badania) oraz wszelkich innych zaobserwowanych skutków niekorzystnych. W przypadkach, gdy jest to możliwe, wyniki liczbowe powinny być ocenione za pomocą odpowiedniej i ogólnie akceptowanej metody statystycznej. Metody statystyczne powinny być wybrane podczas planowania badania.

3. **SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań musi zawierać następujące informacje:

Substancja testowa:

— cechy fizyczne (w tym izomeria, czystość i własności fizykochemiczne),

— dane identyfikacyjne.

Nośnik (w stosownych przypadkach):

— uzasadnienie wyboru nośnika.

Zwierzęta badane:

— wykorzystany gatunek/szczep,

— liczba, wiek i płeć zwierząt,

— źródło, warunki przebywania zwierząt, aklimatyzacja, dieta, itp.,

— — indywidualne masy ciała zwierząt na początku testu.

Warunki testu:

— szczegóły dotyczące przygotowania formy użytkowej substancji testowanej/pożywienia, osiąganego stężenia, trwałości i homogeniczności preparatu,

— wyszczególnienie podawanych dawek, obejmujące szczegóły nośnika, objętości i cech fizycznych podawanego materiału;

— szczegóły podawania substancji testowanej,

— racjonalna podstawa wyboru poziomu dawki,

— racjonalna podstawa wyboru drogi podawania i czasu trwania ekspozycji,

— jeżeli ma zastosowanie, przeliczenie stężenia substancji testowanej w pożywieniu/wodzie pitnej (ppm) na rzeczywistą dawkę (mg/kg masy ciała/dzień),

— szczegóły jakości pożywienia i wody.

Procedury obserwacji i testów:

— szczegóły przydzielania zwierząt każdej grupy do podgrup poddawanych perfuzji,

— szczegóły systemów punktowych, zawierające kryteria i skale punktowe dla każdego pomiaru w szczegółowych obserwacjach klinicznych,

▼B

— szczegóły obserwacji funkcjonalnych pod kątem oceny reaktywności na bodźce różnego typu (np. słuchowe, wzrokowe i czucia głębokiego; oceny siły uchwytu oraz oceny aktywności motorycznej (wraz ze szczegółami urządzeń automatycznych wykrywających aktywność); oraz innych użytych procedur,

— szczegóły badań oftalmologicznych oraz, w stosownych przypadkach, badań hematologicznych oraz klinicznych prób biochemicznych wraz z odpowiednimi wartościami bazowymi,

— szczegóły konkretnych procedur neurobehawioralnych, neuropatologicznych, neurochemicznych i elektrofizj ologicznych.

Wyniki:

— masa ciała/zmiany masy ciała w tym masa ciała w chwili uśmiercenia,

— spożycie pokarmu i spożycie wody, w stosownych przypadkach,

— dane dotyczące reakcji toksycznej w rozbiciu na płcie i poziomy dawek, w tym oznaki toksyczności lub śmiertelność,

— charakter, ciężkość i czas trwania (rozpoczęcie i dalszy przebieg) obserwacji klinicznych (zarówno odwracanych jak i nieodwracalnych),

— szczegółowy opis wszystkich wyników obserwacji funkcjonalnych,

— stwierdzenia sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich stwierdzeń neurobehawioralnych, neuropatologicznych, i neurochemicznych, jeśli takie są dostępne,

— dane dotyczące absorpcji i metabolizmu, w stosownych przypadkach,

— statystyczna obróbka wyników, w stosownych przypadkach,

Dyskusja wyników:

— informacje o reakcji na dawkę,

— związek jakichkolwiek skutków toksycznych z wnioskiem dotyczącym neurotoksycznego potencjału badanego związku chemicznego,

— poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się niekorzystnego skutku.

Wnioski:

— zachęca się do zamieszczenia konkretnego stwierdzenia dotyczącego ogólnej neurotoksyczności badanego związku chemicznego.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD Guidance 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 Organization (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, 999–1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 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, 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, 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, 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, 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, 343–352.

(14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 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, 368–378.

(16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques inNeurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, CL. ed. Raven Press, New York, pp 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, pp. 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

Tabela 1

Minimalne liczby zwierząt w grupach potrzebne w sytuacji, kiedy badanie neurotoksyczności przeprowadzane jest odrębnie lub w połączeniu z innymi badaniami

	BADANIE NEUROTOKSYCZNOŚCI PRZEPROWADZONE JAKO:			
	Odrębne badanie	Połączone z badaniem 28-dniowym	Połączone z badaniem 90-dniowym	Połączone z badaniem toksyczności chronicznej
Całkowita liczba zwierząt na grupę	10 samców i 10 samic	10 samców i 10 samic	15 samców i 15 samic	25 samców i 25 samic
Liczba zwierząt wybrana do obserwacji funkcjonalnych, w tym szczegółowych obserwacji klinicznych	10 samców i 10 samic	10 samców i 10 samic	10 samców i 10 samic	10 samców i 10 samic
Liczba zwierząt wybranych do perfuzji *in situ* i neurohistopatologii	5 samców i 5 samic	5 samców i 5 samic	5 samców i 5 samic	5 samców i 5 samic
Liczba zwierząt wybranych do badań dawki wielokrotnej/obserwacji toksyczności podchronicznej/chronicznej, hematologii, biochemii klinicznej, histopatologii itp., jak wskazano to w odnośnych wytycznych		5 samców i 5 samic	10 samców † i 10 samic †	20 samców † i 20 samic †
Dodatkowe obserwacje w stosownych przypadkach	5 samców i 5 samic			

† Wliczając w to pięć zwierząt wybranych do obserwacji funkcjonalnych i szczegółowych obserwacji klinicznych, stanowiących część badania neurotoksyczności

▼B

Tabela 2

Częstotliwość obserwacji klinicznych i funkcjonalnych

Rodzaj obserwacji		Czas trwania badania			
		Ostra	28-dniowe	90-dniowe	Chroniczna
U wszystkich zwierząt	Ogólny stan zdrowotny	codziennie	codziennie	codziennie	codziennie
	Zachorowalność/ śmiertelność	dwa razy dziennie	dwa razy dziennie	dwa razy dziennie	dwa razy dziennie
U zwierząt wybranych do obserwacji funkcjonalnych	Szczegółowe obserwacje kliniczne	— przed pierwszą ekspozycją — w okresie 8 godzin od dawkowania, w momencie oczekiwanego — maksymalnego skutku w 7 i 14 dniu po dawkowaniu	— przed pierwszą ekspozycją — następnie raz na tydzień	— przed pierwszą ekspozycją — raz w pierwszym lub drugim tygodniu ekspozycji — następnie raz na miesiąc	— przed pierwszą ekspozycją — raz na koniec pierwszego miesiąca ekspozycji — następnie raz na trzy miesiące
	Obserwacje funkcjonalne	— przed pierwszą ekspozycją — w okresie 8 godzin od dawkowania, w momencie oczekiwanego maksymalnego skutku — w 7 i 14 dniu po dawkowaniu skutku	— przed pierwszą ekspozycją — w czwartym tygodniu terapii, najbliżej końca okresu ekspozycji jak to możliwe	— przed pierwszą ekspozycją — raz w pierwszym lub drugim tygodniu ekspozycji — następnie raz na miesiąc	— przed pierwszą ekspozycją — raz, na koniec pierwszego miesiąca ekspozycji — następnie raz na trzy miesiące

▼B

B.44. **ABSORPCJA PRZEZ SKÓRĘ: METODA *IN VIVO***

1. **METODA**

Opisywana metoda badania jest zgodna z wytyczną OECD nr 427 (2004).

1.1. WPROWADZENIE

Ekspozycja na wiele substancji chemicznych następuje głównie przez skórę, natomiast większość badań toksykologicznych na zwierzętach laboratoryjnych skupia się na doustnej drodze podawania. Badanie *in vivo* wchłaniania przez skórę opisane w tej instrukcji dostarcza informacji niezbędnych do ekstrapolowania wyników badań wchłaniania doustnego i wykorzystywania ich do sporządzania oceny bezpieczeństwa po ekspozycji przez skórę.

Zanim substancja dostanie się do układu krążenia, musi ona przejść przez wiele warstw komórek skóry. W przypadku większości substancji o szybkości wchłaniania decyduje warstwa rogowa, składająca się z martwych komórek. Przepuszczalność skóry zależy zarówno od lipofilności substancji chemicznej i grubości zewnętrznej warstwy naskórka, jak również czynników takich, jak masa cząsteczkowa i stężenie substancji. Ogólnie rzecz biorąc, skóra szczurów i królików jest bardziej przepuszczalna niż skóra ludzka, natomiast przepuszczalność skóry świnek morskich i małp bardziej przypomina przepuszczalność skóry ludzkiej.

Metody mierzenia wchłaniania przez skórę można podzielić na dwie kategorie: *in vivo* i *in vitro*. Metoda *in vivo* może dostarczyć istotnych informacji o wchłanianiu przez skórę u różnych gatunków laboratoryjnych. Metody *in vitro* zostały opracowane później. W metodach tych wykorzystuje się transport przez skórę zwierzęcą lub ludzką, pełnej lub niepełnej grubości, do zbiornika płynu. Metodę *in vitro* przedstawiono osobno w opisie innej metody badania (1). W celu doboru najwłaściwszej metody w danej sytuacji zaleca się skonsultować wytyczną OECD na temat przeprowadzania badań wchłaniania przez skórę (2), bowiem zawiera ona więcej szczegółowych informacji na temat stosowalności obu metod.

Opisywana poniżej metoda *in vivo* pozwala na określenie stopnia przenikania substancji testowej przez skórę do systemu. Technika ta jest powszechnie stosowana od wielu lat (3)(4)(5)(6)(7). Wprawdzie badania wchłaniania przez skórę *in vitro* mogą w wielu przypadkach być odpowiednie, w niektórych sytuacjach potrzebnych danych dostarczyć mogą jedynie badania *in vivo*.

Zalety metody *in vivo* polegają na tym, że stosując ją, wykorzystuje się nienaruszony fizjologicznie i metabolicznie system, używa się gatunków wspólnych dla wielu badań nad toksycznością, zaś metoda po modyfikacji może być stosowana do badań na innych gatunkach. Wadami są konieczność użycia żywych zwierząt, potrzeba stosowania materiałów znakowanych promieniotwórczo w celu uzyskania wiarygodnych wyników, trudności z określeniem wczesnej fazy wchłaniania oraz różnice w przepuszczalności skóry preferowanych gatunków (szczur) i człowieka. Skóra zwierzęca jest na ogół bardziej przepuszczalna i w związku z tym badania prowadzone z jej wykorzystaniem mogą prowadzić do przeszacowania wchłaniania przez skórę u ludzi (6)(8)(9). Na żywych zwierzętach nie należy testować substancji żrących lub korozyjnych.

▼B

1.2. DEFINICJE

Dawka niepochłonięta: jest to dawka spłukana z powierzchni skóry po ekspozycji i wszelkie substancje obecne w miejscach nieprzepuszczalnych, w tym wszelkie substancje, o których wiadomo, że wyparowały ze skóry w czasie ekspozycji.

Dawka pochłonięta *(in vivo)*: obejmuje substancję obecną w moczu, materiale wypłukanym z klatki, odchodach, wydychanym powietrzu (jeśli mierzono), krwi, tkankach (jeśli pobierano) oraz innych częściach ciała po usunięciu skóry w miejscu nałożenia substancji.

Dawka wchłanialna: jest masą substancji obecnej na lub w skórze po zmyciu.

1.3. ZASADA METODY BADANIA

Substancja testowa, najlepiej znakowana izotopem promieniotwórczym, nakładana jest na wystrzyżoną skórę zwierzęcia w odpowiedniej dawce lub dawkach, w takiej postaci, w jakiej jest normalnie używana. Aby zapobiec zjedzeniu przez zwierzę preparatu testowego pozostającego w kontakcie ze skórą przez określony czas, zabezpiecza się go odpowiednim opatrunkiem (nieokluzyjnym, semiokluzyjnym lub okluzyjnym). Pod koniec okresu ekspozycji opatrunek jest usuwany, a skóra czyszczona odpowiednim środkiem czyszczącym. Opatrunek i materiały użyte do czyszczenia są zachowane do analizy i zakładany jest świeży opatrunek. Przed, w trakcie i po okresie ekspozycji zwierzęta są umieszczane w oddzielnych klatkach metabolicznych. W tych okresach do celów analizy pobierane są wydaliny i wydychane powietrze. Pobieranie wydychanego powietrza nie jest konieczne, jeśli istnieje dostatecznie dużo informacji, że lotne metabolity promieniotwórcze powstają w niewielkich ilościach lub nie tworzą się wcale. Zwykle bada się kilka grup zwierząt, które poddaje się działaniu preparatu testowego. Jedna grupa jest zabijana po zakończeniu okresu ekspozycji. Inne grupy są zabijane później zgodnie z harmonogramem (2). Na koniec okresu pobierania próbek zabijane są pozostałe zwierzęta, pobierana jest krew do analizy, skóra w miejscu nałożenia substancji wycinana do analizy, a ciało poddawane badaniu w poszukiwaniu niewydalonego materiału. Próbki są badane w odpowiedni sposób i oznaczany jest poziom wchłaniania przez skórę (6)(8)(9).

1.4. OPIS METODY BADANIA

1.4.1. **Dobór gatunków zwierząt**

Najczęściej wykorzystuje się do tego celu szczury, ale można również użyć linii bezwłosych i gatunków, których intensywność wchłaniania przez skórę jest podobna do tej u człowieka (3)(6)(7)(8)(9). Należy użyć młodych, dorosłych zwierząt jednej płci (standardowo używa się samców) i linii powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach. Na początku badań zróżnicowanie masy zwierząt nie powinno przekraczać ± 20 % średniej masy. Na przykład odpowiednie są samce szczurów o masie w zakresie 200–250 g, zwłaszcza o masie z górnej połowy tego zakresu.

▼B

1.4.2. **Liczba oraz płeć zwierząt**

Do każdego preparatu testowego i każdego zaplanowanego czasu zabijania należy użyć co najmniej czterech zwierząt jednej płci. Każda grupa zwierząt jest zabijana po różnym czasie, na przykład na koniec okresu ekspozycji (zwykle po 6 lub 24 godzinach) i następnie po kolejnych okresach (np. 48 i 72 godzinach). Jeśli są dostępne dane świadczące o istotnej różnicy między samcami i samicami w zakresie toksyczności skórnej, należy wybrać bardziej wrażliwą płeć. Jeśli brak takich danych, można użyć zwierząt dowolnej płci.

1.4.3. **Warunki w pomieszczeniach dla zwierząt i pożywienie**

Temperatura w pomieszczeniu ze zwierzętami doświadczalnymi powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Mimo że wilgotność względna powinna poza okresem sprzątania pomieszczenia wynosić co najmniej 30 % i raczej poniżej 70 %, należy starać się ją utrzymać na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Stosować można konwencjonalny pokarm laboratoryjny, który powinien być dostępny bez ograniczeń, podobnie jak woda. W czasie badań, a najlepiej także w okresie aklimatyzacji, zwierzęta są trzymane w osobnych klatkach metabolicznych. Należy zminimalizować możliwość rozsypywania pokarmu lub rozlewania wody, ponieważ może to mieć wpływ na wyniki.

1.4.4. **Przygotowanie zwierząt**

Zwierzęta są indywidualnie znakowane w celu umożliwienia identyfikacji osobników i trzymane w swoich klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem badań w celu zapewnienia aklimatyzacji do warunków laboratoryjnych.

Po okresie aklimatyzacji i około 24 godziny przed zastosowaniem dawki na skórze każdego zwierzęcia w rejonie barków i grzbietu zostanie wystrzyżona skóra. Przepuszczalność skóry uszkodzonej jest inna niż skóry nieuszkodzonej, należy więc uważać, aby nie zranić zwierzęcia. Po wystrzyżeniu skóry i około 24 godziny przed nałożeniem substancji testowej na skórę (zob. część 1.4.7) powierzchnię skóry należy przetrzeć acetonem, aby usunąć łój. Dodatkowe przemywanie mydłem i wodą nie jest zalecane, ponieważ wszelkie resztki mydła mogą zwiększać wchłanianie substancji testowej. Aby umożliwić przeprowadzenie wiarygodnych obliczeń wchłaniania w przeliczeniu na 1 cm^2 powierzchnia skóry, na którą nakładana jest substancja musi być wystarczająco duża, najlepiej co najmniej 10 cm^2. Taką powierzchnię można uzyskać u szczurów o masie 200–250 g. Po przygotowaniu zwierzęta są wkładane z powrotem do klatek metabolicznych.

1.4.5. **Substancja testowa**

Substancja testowa jest substancją, której właściwości przenikania są poddawane badaniu. W idealnym przypadku substancja testowa powinna być znakowana izotopami promieniotwórczymi.

1.4.6. **Przygotowanie do badania**

Preparat substancji testowej (np. czysty, rozcieńczony lub materiał przygotowany według receptury, zawierający nakładaną na skórę substancję) powinien być taki sam (lub być realistycznym surogatem) jak substancja, na której działanie narażani są ludzie lub inne gatunki docelowe. Każda różnica między preparatem a wykorzystywaną substancją musi być uzasadniona. W razie potrzeby badaną substancję rozpuszcza się lub sporządza jej zawiesinę w odpowiednim podłożu. W przypadku podłoża innego niż woda powinna być znana charakterystyka absorpcji oraz potencjalne interakcje z substancją testową.

▼B

1.4.7. **Nakładanie na skórę**

Na powierzchni skóry wyznacza się miejsce nakładania o określonej powierzchni. Następnie równomiernie nakłada się na to miejsce preparat testowy. Jego ilość powinna zwykle imitować potencjalną ekspozycję u człowieka, zwykle 1–5 mg/cm^2 w przypadku substancji stałej i do 10 $\mu l/cm^2$ w przypadku płynu. Zastosowanie jakiejkolwiek innej ilości powinno być uzasadnione oczekiwanymi warunkami użycia, celami badania lub fizycznymi właściwościami preparatu testowego. Po nałożeniu preparatu miejsce nałożenia musi być chronione przed wylizywaniem przez zwierzę. Przykład typowego urządzenia pokazano na rysunku 1. Zazwyczaj miejsce nakładania powinno być chronione nieokluzyjnym opatrunkiem (np. przepuszczalną nylonową gazą). W przypadku dawek nieograniczonych miejsce nakładania powinno być przykryte opatrunkiem okluzyjnym. W przypadku gdy parowanie półlotnych substancji testowych zmniejsza wskaźnik odzysku substancji testowej do niedopuszczalnego poziomu (zob. także część 1.4.10 akapit pierwszy), konieczne jest zebranie wyparowanej substancji do filtra z węgla aktywowanego, pokrywającego urządzenie do nakładania (zob. rysunek 1). Ważne jest, żeby żadne urządzenie nie uszkadzało skóry, nie absorbowało substancji testowej, ani nie wchodziło z nią w reakcję. Zwierzęta wkłada się z powrotem do klatek metabolicznych, w celu zebrania wydalin.

1.4.8. **Czas trwania ekspozycji i pobieranie próbek**

Czas trwania ekspozycji jest czasem między nałożeniem a usunięciem preparatu przez zmycie go ze skóry. Należy zastosować odpowiedni czas ekspozycji (zwykle 6 lub 24 godziny), dostosowując go do czasu trwania ekspozycji u ludzi. Po okresie ekspozycji zwierzęta są trzymane w klatkach metabolicznych do czasu planowego uśmiercenia. Przez cały czas trwania badania zwierzęta powinny być regularnie obserwowane pod kątem oznak toksyczności lub anormalnych reakcji. Po zakończeniu okresu ekspozycji należy zaobserwować, czy na skórze narażonej na działanie substancji nie wystąpią objawy podrażnienia.

Klatki metaboliczne powinny pozwolić na oddzielne pobieranie moczu i kału przez cały czas badania. Powinny także umożliwiać pobieranie znakowanego węglem ^{14}C dwutlenku węgla oraz lotnych związków węgla ^{14}C, które należy poddać analizie, jeśli pojawiają się większe ilości (> 5 %). Dla każdej grupy i w trakcie każdego pobierania próbek należy osobno pobrać mocz, kał i płyny, w których znalazła się badana substancja (np. dwutlenek węgla ^{14}C i lotne związki ^{14}C). Jeśli jest wystarczająco dużo danych świadczących, że tworzy się niewiele lotnych promieniotwórczych metabolitów lub nie tworzą się one wcale, można stosować klatki otwarte.

Wydaliny są zbierane podczas ekspozycji, do 24 godzin po pierwszym kontakcie ze skórą, następnie codziennie do końca eksperymentu. Zazwyczaj wystarczają trzy okresy pobierania wydalin, jednak zakładane przeznaczenie preparatu testowego lub istniejące dane kinetyczne mogą wskazywać na potrzebę pobrania tego materiału w innych lub dodatkowych terminach.

Na zakończenie okresu ekspozycji urządzenie zabezpieczające jest zdejmowane z każdego zwierzęcia i zatrzymywane do osobnej analizy. Skóra w miejscu poddania działaniu substancji testowej powinna być u wszystkich zwierząt co najmniej trzykrotnie przemyta środkiem czyszczącym przy użyciu odpowiednich tamponów. Należy uważać, aby nie doprowadzić do skażenia innych części ciała. Środek czyszczący powinien być reprezentatywny dla środków stosowanych do zwykłych czynności higienicznych, np. wodny roztwór mydła. Na koniec należy wysuszyć skórę. Wszystkie tampony i płyny pozostałe po przemywaniu muszą być zachowane do analizy. Zwierzętom tworzącym grupy badane przez dłuższy okres należy przed włożeniem ich z powrotem do klatek nałożyć świeży opatrunek, chroniący miejsce poddane działaniu substancji testowej.

▼B

1.4.9. **Procedury końcowe**

W każdej grupie zwierzęta należy uśmiercić zgodnie z harmonogramem i pobrać krew do badań. Urządzenie ochronne lub opatrunek należy zdjąć w celu poddania analizie. Z każdego zwierzęcia powinien zostać pobrany i poddany analizie fragment skóry z miejsca nałożenia substancji oraz podobny, ostrzyżony fragment skóry, który nie był poddany działaniu substancji. Skóra z miejsca poddanego działaniu substancji testowej może zostać podzielona na frakcje, by oddzielić warstwę rogową od głębszej warstwy naskórka w celu uzyskania dokładniejszych informacji na temat rozmieszczenia substancji testowej. Określenie takiego odkładania się substancji w okresie po ekspozycji powinno dostarczyć pewnych danych na temat losu wszystkich substancji testowych w warstwie rogowej. Aby ułatwić dzielenie skóry (po ostatnim myciu skóry i uśmierceniu zwierzęcia), należy zdjąć opatrunek ochronny. Skóra z miejsca nałożenia substancji testowej, wraz z pierścieniem dookoła, jest wycinana i rozpinana na płytce. Przy zastosowaniu delikatnego nacisku na powierzchnię skóry przykleja się kawałek taśmy klejącej. Następnie odkleja się go wraz z częścią warstwy rogowej. Kolejne paski taśmy są naklejane, dopóki taśma przestanie przywierać do powierzchni skóry po usunięciu całej warstwy rogowej. Wszystkie paski taśmy pochodzące od jednego zwierzęcia mogą być umieszczone razem w jednym pojemniku, do którego dodaje się środek trawiący tkanki w celu rozpuszczenia fragmentów warstwy rogowej. Przed poddaniem reszty ciała analizie mającej określić dawkę wchłoniętą przez organizm, można pobrać wszelkie potencjalne tkanki docelowe. Ciała poszczególnych osobników należy zachować do analizy. Zwykle wystarcza analiza całkowitej zawartości. Do odrębnej analizy można pobrać określone organy (jeśli tak zalecono w innych badaniach). Do wcześniej zebranych próbek moczu należy dodać mocz obecny w pęcherzu w momencie uśmiercania zwierzęcia. Po zebraniu wydalin z klatek metabolicznych w zaplanowanym terminie uśmiercania zwierzęcia całe klatki powinny zostać umyte odpowiednim rozpuszczalnikiem. Podobnie należy poddać analizie inne urządzenia, które mogły ulec skażeniu.

1.4.10. **Analiza**

We wszystkich badaniach należy osiągnąć odpowiednią wartość odzysku (tj. średnio 100 ± 10 % radioaktywności). Poziom odzysku poza tym przedziałem powinien zostać uzasadniony. Wielkość zastosowanej dawki w każdej próbie powinna zostać przeanalizowana przy użyciu odpowiednio udokumentowanych procedur.

Dla każdej procedury nakładania dawki w opracowaniu statystycznym powinna się znaleźć miara wariancji dla powtórzeń.

2. **DANE**

W przypadku każdego zwierzęcia w każdym okresie pobierania próbek dla testowanej substancji i/lub jej metabolitów należy przeprowadzić następujące pomiary. Poza danymi indywidualnymi należy podać średnie dla danych pogrupowanych według czasów pobierania.

— ilość związana z urządzeniami ochronnymi,

— ilość, która może zostać usunięta ze skóry,

— ilość substancji w/na skórze, której nie można zmyć ze skóry,

▼B

— ilość w próbce krwi,

— ilość w wydalinach i wydychanym powietrzu (jeśli znajduje to zastosowanie),

— ilość pozostająca w martwym ciele i wszelkich organach pobranych do oddzielnej analizy.

Oznaczenie ilości substancji testowej i/lub metabolitów w wydalinach, wydychanym powietrzu, krwi i w martwym ciele umożliwi określenie całkowitej ilości zaabsorbowanej w każdym punkcie czasowym. Można również dokonać obliczenia ilości substancji chemicznej wchłanianej na 1 cm^2 skóry poddanej działaniu substancji testowej.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać wymagania określone w protokole, w tym uzasadnienie użytego systemu testowego i powinien obejmować, co następuje:

Substancja testowa:

— dane identyfikacyjne (np. numer CAS, jeśli dostępny; źródło; czystość (czystość radiochemiczna); znane zanieczyszczenia; numer partii),

— własności fizyczne, właściwości fizykochemiczne (np. pH, lotność, rozpuszczalność, stabilność, masa cząsteczkowa i log P_{ow}).

Preparat testowy:

— forma i uzasadnienie użycia,

— szczegółowe dane o preparacie testowym, ilość zastosowanej substancji, uzyskane stężenia, podłoże, stabilność i homogeniczność.

Zwierzę testowe:

— wykorzystany gatunek/szczep,

— liczba, wiek i płeć zwierząt,

— źródło zwierząt, warunki przetrzymywania zwierząt, pokarm, itd.,

— masa poszczególnych zwierząt na początku testu.

Warunki badania:

— szczegółowe informacje na temat podawania preparatu testowego (miejsce nakładania, metody pobierania próbek, okluzja/bez okluzji, objętość, ekstrakcja, wykrywanie),

— szczegółowe informacje o pokarmie i jakości wody.

Wyniki:

— wszelkie oznaki toksyczności,

— dane tabelaryczne dotyczące wchłaniania (wyrażone jako tempo, ilość lub procent),

▼B

— sumaryczne wartości odzysku w eksperymencie,

— interpretacja wyników, porównanie z wszelkimi dostępnymi danymi na temat wchłaniania przez skórę związku testowego.

Omówienie wyników.

Wnioski.

4. **LITERATURA**

(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 RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829–835.

(5) Kemppainen BW, 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.

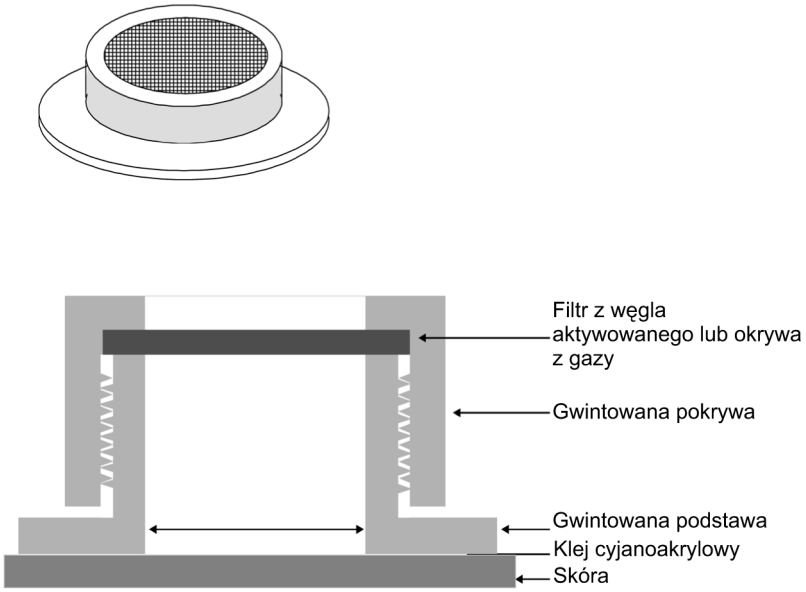
(8) Bronaugh R.L., Wester RC, Bucks D., Maibach H.I. and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369–373.

(9) Feldman R.J. and Maibach H.I. (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399–404.

▼B

Rysunek 1

Przykład konstrukcji typowego urządzenia stosowanego do wyznaczania i zabezpieczenia miejsca stosowania substancji na skórze w trakcie badań *in vivo* wchłaniania przez skórę



▼B

B.45. **ABSORPCJA PRZEZ SKÓRĘ: METODA *IN VITRO***

1. **METODA**

Opisywana metoda badania jest zgodna z wytyczną OECD nr 428 (2004).

1.1. WPROWADZENIE

Metoda ta została opracowana, aby dostarczyć informacji na temat wchłaniania substancji testowej nakładanej na wycinek skóry. Może być stosowana w połączeniu z metodą badania wchłaniania przez skórę *in vivo* (1) lub oddzielnie. Zaleca się, aby przy opracowywaniu badań opartych na tej metodzie korzystać z wytycznej OECD dotyczącej badań wchłaniania przez skórę (2). Wytyczna została opracowana, aby ułatwić wybór odpowiednich procedur *in vitro*, nadających się do stosowania w określonych okolicznościach, w celu zapewnienia wiarygodności wyników uzyskanych tą metodą.

Metody pomiaru wchłaniania przez skórę oraz ilości substancji dostającej się do organizmu przez skórę można podzielić na dwie kategorie: *in vivo* i *in vitro*. Metody *in vivo* badania wchłaniania przez skórę są dobrze opracowane i dostarczają informacji o farmakokinetyce u wielu różnych gatunków. Informacje o metodzie *in vivo* przedstawiono osobno w opisie innej metody badania (1). Także metody *in vitro* są stosowane do pomiaru wchłaniania przez skórę od wielu lat. Wprawdzie nie przeprowadzono formalnych badań walidacyjnych metod *in vitro* składających się na niniejszą metodę badania, jednakże specjaliści OECD zgodzili się w 1999 r., że istnieje wystarczająco dużo udokumentowanych danych na poparcie metody *in vitro* (3). Więcej szczegółowych informacji uzasadniających to poparcie, w tym znaczną liczbę bezpośrednich porównań metod *in vitro* i *in vivo,* zamieszczono w wytycznej (2). Istnieją monografie, w których omówiono ten temat i przedstawiono szczegółowy zakres stosowania metody *in vitro* (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). Metody *in vitro* umożliwiają pomiar rozprzestrzeniania się substancji chemicznych w głąb skóry i na jej powierzchni, a następnie do zbiornika płynu. W badaniu używa się zarówno martwej skóry, służącej wyłącznie do pomiaru dyfuzji, jak i skóry świeżej, aktywnej metabolicznie, pozwalającej na równoczesne badanie dyfuzji i metabolizmu skóry. Takie metody znalazły zastosowanie przy porównywaniu przenikania związków chemicznych zawartych w różnych substancjach chemicznych w głąb skóry i przez skórę, mogą też umożliwić uzyskanie użytecznych modeli oceny wchłaniania przezskórnego u ludzi.

Stosowanie metody *in vitro* może być niemożliwe we wszystkich warunkach i w przypadku wszystkich kategorii związków chemicznych. Można korzystać z metody badania *in vitro* do wstępnej oceny jakościowej przenikania przez skórę. W niektórych przypadkach konieczne może być na dalszym etapie przeprowadzenie badań *in vivo*. W celu dokładniejszego poznania sytuacji, w których metoda *in vitro* byłaby odpowiednia, należy sięgnąć do wytycznej (2). Dodatkowe szczegółowe informacje przydatne przy podejmowaniu decyzji zamieszczono w (3).

W opisie metody zawarto ogólne zasady pomiaru wchłaniania przez skórę i dopływu substancji testowej przy użyciu wycinka skóry. Możliwe jest użycie skóry wielu gatunków ssaków, w tym człowieka. Właściwości skóry związane z przepuszczalnością są zachowywane po wycięciu jej fragmentu z organizmu, ponieważ główną barierę przenikania stanowi martwa warstwa rogowa. Aktywny transport substancji chemicznych przez skórę nie został stwierdzony. Wykazano, że skóra ma zdolność metabolizowania niektórych związków chemicznych podczas wchłaniania przezskórnego (6), jednak proces ten nie zmniejsza ilości rzeczywiście wchłanianej dawki, choć może mieć wpływ na naturę substancji dostającej się do krwi.

▼B

1.2. DEFINICJE

Dawka niepochłonięta: jest to dawka spłukana z powierzchni skóry po ekspozycji i wszelkie substancje obecne w miejscach nieprzykrytych, w tym wszelkie substancje, o których wiadomo, że wyparowały ze skóry w czasie ekspozycji.

Dawka pochłonięta *(in vitro)*: masa substancji testowej docierającej do płynu receptorowego lub układu krążenia w określonym czasie.

Dawka wchłanialna *(in vitro)*: jest masą substancji obecnej na lub w skórze po zmyciu.

1.3. ZASADA METODY BADANIA

Substancja testowa, która może być znakowana izotopem promieniotwórczym jest nakładana na powierzchnię próbki skóry oddzielającej dwie części komory dyfuzyjnej. Substancja pozostaje na skórze w określonych warunkach, przez określony czas, zanim zostanie usunięta w trakcie odpowiedniej procedury mycia. Próbki płynu receptorowego są pobierane w odstępach czasowych w trakcie całego badania i analizowane pod kątem obecności substancji testowej i/lub metabolitów.

W przypadku stosowania systemów aktywnych metabolicznie można odpowiednimi metodami analizować metabolity substancji testowej. Na koniec eksperymentu, w razie potrzeby, rozmieszczenie substancji testowej i jej metabolitów jest wyrażane ilościowo.

W odpowiednich warunkach przedstawionych w opisie tej metody oraz w wytycznej (2), absorpcja substancji testowej w określonym czasie jest mierzona za pomocą analizy płynu receptorowego i badanej skóry. Substancja testowa pozostająca w skórze jest uznawana za zaabsorbowaną, chyba że uda się wykazać, iż poziom absorpcji można ustalić wyłącznie na podstawie wartości płynu receptorowego. Analiza innych komponentów (materiał spłukany ze skóry i pozostający w obrębie warstw skóry) umożliwia dalszą ocenę danych, w tym całkowitego rozmieszczenia substancji testowej i odzysku wyrażonego w procentach.

Aby wykazać sprawność i wiarygodność systemu testów w przeprowadzającym je laboratorium, należy dysponować wynikami odnoszącymi się do odpowiednich substancji wzorcowych, a wyniki te powinny być zgodne z publikacjami na temat wykorzystywanej metody. Wymóg ten można spełnić przeprowadzając test przy użyciu odpowiedniej substancji wzorcowej (najlepiej o lipofilności zbliżonej do lipofilności substancji testowej) równocześnie przy użyciu substancji testowej albo dostarczając odpowiednich danych historycznych dla różnych substancji wzorcowych o zróżnicowanej lipofilności (np. kofeina, kwas benzoesowy i testosteron).

1.4. OPIS METODY BADANIA

1.4.1. **Komora dyfuzyjna**

Komora dyfuzyjna składa się z dwóch części, donorowej i receptorowej, pomiędzy którymi umieszczona jest skóra (przykład typowego układu przedstawiono na rysunku 1). Komora powinna zapewnić szczelność wokół skóry, pozwalać na łatwe pobieranie próbek i dobre mieszanie roztworu receptorowego pozostającego w kontakcie ze spodnią częścią skóry oraz sprawną regulację temperatury komory i jej zawartości. Dopuszczalny jest zarówno układ statyczny, jak i przepływ przez komory dyfuzyjne. W czasie ekspozycji ograniczonej dawki substancji testowej części donorowe są zwykle otwarte. Jednak w przypadku stosowania nieograniczonych dawek lub przy pewnych scenariuszach stosowania dawek ograniczonych, części donorowe mogą pozostawać zamknięte.

▼B

1.4.2. **Płyn receptorowy**

Preferowane jest stosowanie płynu receptorowego o fizjologicznej przewodności, można jednak stosować również inne płyny, jeśli ich użycie jest uzasadnione. Należy dostarczyć precyzyjnych danych o składzie płynu receptorowego. Należy zapewnić odpowiednią rozpuszczalność substancji testowej w płynie receptorowym, tak aby nie stanowił bariery absorpcji. Ponadto płyn receptorowy nie powinien wpływać na kompletność preparatu skóry. W systemach przepływowych szybkość przepływu nie powinna hamować dyfuzji substancji testowej do płynu receptorowego. W systemie komory statycznej płyn powinien być nieustannie mieszany, a próbki powinny być pobierane regularnie. Jeśli przedmiotem badań jest metabolizm, płyn receptorowy musi zapewnić żywotność skóry przez cały czas trwania eksperymentu.

1.4.3. **Preparaty skóry**

Można użyć skóry ludzkiej lub zwierzęcej. Uznaje się, że zastosowanie ludzkiej skóry podlega międzynarodowym zastrzeżeniom i warunkom etycznym. Wprawdzie preferowana jest żywa skóra, można jednak użyć również skóry martwej, pod warunkiem że można wykazać kompletność wycinka. Jako błony do dyfuzji można użyć preparatu naskórka (wyizolowanego metodami enzymatycznymi, cieplnymi lub chemicznymi) lub płata skóry niepełnej grubości (zwykle o grubości 200–400 μm) przygotowanego za pomocą dermatomu. Płat skóry pełnej grubości może być użyty, jednakże należy unikać zbyt dużej grubości (ca > 1 mm), chyba że ma on służyć do oznaczenia ilości substancji chemicznej w warstwach skóry. Wybór gatunku, miejsca anatomicznego i techniki preparacji musi być uzasadniony. Wymagane są odpowiednie dane z co najmniej czterech powtórzeń na każdy preparat testowy.

1.4.4. **Kompletność preparatu skóry**

Właściwe przygotowanie preparatu skóry ma zasadnicze znaczenie. Nieodpowiednie postępowanie może spowodować uszkodzenie warstwy rogowej, dlatego należy sprawdzać kompletność przygotowanej próbki skóry. W przypadku badania metabolizmu skóry należy używać świeżo pobranych wycinków skóry przy zachowaniu warunków, o których wiadomo, że sprzyjają zachowaniu aktywności metabolicznej. Generalnie zaleca się użyć wycinka skóry w ciągu 24 godzin od jego pobrania, jednak dopuszczalny okres przechowywania może być różny, w zależności od systemu enzymatycznego uczestniczącego w metabolizmie oraz od temperatury przechowywania (13). Jeśli preparaty skórne były przed użyciem przechowywane, należy przedstawić dane dowodzące, że funkcja bariery została zachowana.

1.4.5. **Substancja testowa**

Substancja testowa jest substancją, której właściwości przenikania są poddawane badaniu. W idealnym przypadku substancja testowa powinna być znakowana izotopami promieniotwórczymi.

1.4.6. **Preparat testowy**

Preparat substancji testowej (np. czysty, rozcieńczony lub materiał przygotowany według receptury, zawierający substancję nakładaną na skórę) powinien być taki sam (lub być realistycznym surogatem) jak substancja, na działanie której mogą być narażeni ludzie lub inne gatunki docelowe. Każda różnica między preparatem a wykorzystywaną substancją musi być uzasadniona.

▼B

1.4.7. **Stężenia i formy substancji testowych**

Zwykle stosuje się więcej niż jedno stężenie substancji testowej, sięgające górnej granicy potencjalnych dawek, na które narażany jest człowiek. Należy także rozważyć poddanie testom różnych typowych form substancji.

1.4.8 **Nakładanie na skórę**

W normalnych warunkach człowiek jest narażany na działanie ograniczonych dawek substancji chemicznej. Z tego powodu należy nakładać testowaną substancję w sposób imitujący ekspozycję, na jaką narażany jest człowiek. Zwykle należy stosować 1–5 mg/cm^2 w przypadku substancji stałej i do 10 $\mu l/cm^2$ w przypadku płynów. Zastosowanie określonej ilości powinno być uzasadnione oczekiwanymi warunkami użycia, celami badania lub fizycznymi właściwościami preparatu testowego. Na przykład dawki nakładane na skórę mogą być nieograniczone tam gdzie nakładane są duże objętości na jednostkę powierzchni skóry.

1.4.9. **Temperatura**

Temperatura wpływa na dyfuzję bierną substancji chemicznych (i wobec tego na wchłanianie przez skórę). Komora dyfuzyjna i skóra powinny mieć stałą temperaturę, zbliżoną do normalnej temperatury skóry: 32 ± 1 ^oC. Różne konstrukcje komory dyfuzyjnej wymagają zastosowania różnej temperatury łaźni wodnych lub bloków grzewczych, aby mieć pewność, że receptor/skóra odpowiadają normie fizjologicznej. Wilgotność powinna mieścić się w przedziale 30–70 %.

1.4.10. **Czas trwania ekspozycji i pobieranie próbek**

Ekspozycja skóry na preparat testowy może trwać przez cały czas trwania eksperymentu lub przez krótszy czas (np. w celu imitacji określonego rodzaju ekspozycji, na którą narażany jest człowiek). Nadmiar preparatu testowego należy zmyć ze skóry za pomocą odpowiedniego środka czyszczącego, a spłukany materiał zebrać w celu poddania go analizie. Procedura usuwania preparatu testowego zależy od przewidywanych warunków stosowania i należy ją uzasadnić. W celu uzyskania odpowiedniej charakterystyki profilu absorpcji zwykle wymagany jest 24-godzinny okres pobierania próbek. Ponieważ po okresie dłuższym niż 24 godziny stan skóry może zacząć się pogarszać, czas pobierania próbek nie powinien zazwyczaj przekraczać 24 godzin. W przypadku substancji testowych szybko wnikających w skórę może to nie być konieczne, jednak w przypadku substancji testowych, które wnikają powoli, mogą być konieczne dłuższe okresy pobierania próbek. Częstotliwość pobierania próbek płynu receptorowego powinna umożliwić graficzne przedstawienie profilu absorpcyjnego substancji testowej.

1.4.11. **Procedury końcowe**

Wszystkie elementy systemu testowego powinny być poddane analizie. Należy również oznaczyć wielkość odzysku. Obejmuje to część donorową komory dyfuzyjnej, spłukiwanie powierzchni skóry, preparat skórny oraz płyn receptorowy/komorę receptorową. W niektórych przypadkach skóra może być frakcjonowana na powierzchnię eksponowaną i powierzchnię pod kryzą komory oraz na frakcje warstwy rogowej, naskórka i skóry właściwej, poddawane odrębnym analizom.

1.4.12. **Analiza**

We wszystkich badaniach należy osiągnąć odpowiedni poziom odzysku (celem powinna być średnia 100 ± 10 % promieniotwórczości, wszelkie odchylenia należy uzasadnić). Analizie przy użyciu odpowiedniej techniki powinna zostać poddana substancja testowa obecna w płynie receptorowym, materiale zmytym z powierzchni skóry i wypłukanym z aparatury.

▼B

2. **DANE**

Należy opisać wyniki analizy płynu receptorowego, rozmieszczenie testowanej substancji chemicznej w systemie testowym oraz zmiany profilu absorpcji w czasie. Jeśli ekspozycja polega na stosowaniu dawki ograniczonej, należy obliczyć ilość substancji spłukiwanej ze skóry, ilość związaną ze skórą (i w różnych warstwach skóry, jeśli jest to przedmiotem analizy) oraz ilość substancji obecnej w płynie receptorowym (współczynnik oraz ilość lub procent stosowanej dawki). Czasami możliwe jest określenie absorpcji przez skórę przy wykorzystaniu wyłącznie danych o płynie receptorowym. Jeśli jednak w momencie zakończenia badań w skórze pozostaje substancja testowa, może być konieczne uwzględnienie jej przy obliczaniu całkowitej zaabsorbowanej ilości (zob. poz. bibliograficzna (3) pkt 66). W przypadku zastosowania do ekspozycji dawki nieograniczonej, dane mogą pozwolić na obliczenie stałej przenikalności (Kp). W ostatnim przypadku procent zaabsorbowanej substancji nie ma znaczenia.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać wymagania określone w protokole, w tym uzasadnienie użycia systemu testowego, i powinno obejmować, co następuje:

Substancja testowa:

— właściwości fizyczne i fizykochemiczne (przynajmniej masa cząsteczkowa i log P_{ow}), czystość (czystość radiochemiczna),

— informacje identyfikacyjne (np. nr partii),

— rozpuszczalność w płynie receptorowym.

Preparat testowy:

— forma i uzasadnienie użycia,

— homogeniczność.

Warunki badania:

— źródło i miejsce pobrania skóry, metodę preparacji, warunki przechowywania przed użyciem, wszelkie wstępne zabiegi (oczyszczanie, traktowanie antybiotykami itd.), pomiary kompletności skóry, status metaboliczny, uzasadnienie użycia,

— konstrukcję komory, skład płynu receptorowego, szybkość przepływu płynu receptorowego oraz czas i procedury pobierania próbek,

— szczegóły dotyczące nakładania preparatu testowego i kwantyfikacja stosowanej dawki,

— czas trwania ekspozycji,

— szczegółowe informacje dotyczące usuwania preparatu testowego ze skóry, np. spłukiwanie skóry,

— szczegółowe dane o skórze i wszelkich technikach frakcjonowania użytych do podziału skóry,

▼B

— procedury mycia komory i sprzętu,

— metody pobierania próbek, techniki ekstrakcji, granice wykrywania i walidacja metod analitycznych.

Wyniki:

— ogólna ilość substancji odzyskiwanej w toku eksperymentu (dawka zastosowana materiał zmyty ze skóry + skóra + płyn receptorowy + płyn z płukania komory),

— tabelaryczne zestawienie odzysków w poszczególnych częściach komory,

— profil absorpcji,

— dane tabelaryczne dotyczące wchłaniania (wyrażone jako tempo, ilość lub procent).

Omówienie wyników.

Wnioski.

4. **LITERATURA**

(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,* R.L. Bronaugh and H.I. Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237–241.

(6) Bronaugh R.L. and Maibach H.I. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications.* 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, 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

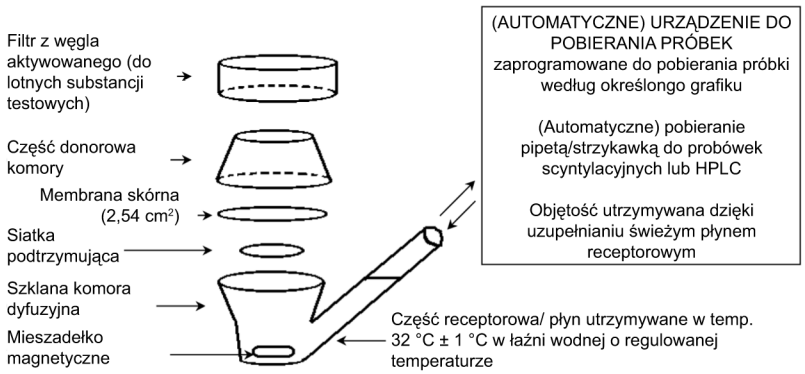
(11) Schaefer H. and Redelmeier T.E. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(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: 356–365.

Rysunek 1

Przykład typowej konstrukcji statycznej komory dyfuzyjnej do badań *in vitro* wchłaniania przezskórnego



▼M8

B.46. BADANIE DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO*: METODA BADANIA Z UŻYCIEM ZREKONSTRUOWANEGO LUDZKIEGO NASKÓRKA

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 439 (2015). Działanie drażniące na skórę oznacza powodowanie odwracalnego uszkodzenia skóry w wyniku nałożenia na skórę badanej substancji chemicznej na okres do 4 godzin [zgodnie z definicją Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ)] (1) i z unijnym rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (rozporządzenie CLP) ([1]). Niniejsza metoda badawcza obejmuje procedurę *in vitro*, która może być wykorzystywana do identyfikacji zagrożeń w przypadku drażniących chemikaliów (substancji i mieszanin) zgodnie z GHS ONZ i rozporządzeniem CLP kategorii 2 (2). W regionach, które nie przyjęły fakultatywnej kategorii 3 GHS ONZ (lekko drażniące), niniejsza metoda badawcza może być wykorzystywana również w celu zidentyfikowania chemikaliów niezakwalifikowanych do żadnej kategorii. Dlatego w zależności od ram regulacyjnych oraz wykorzystywanego systemu klasyfikacji, niniejszą metodę badawczą można wykorzystać do ustalenia drażliwości na skórę substancji chemicznych na podstawie samodzielnego badania zastępczego dla badania działania drażniącego na skórę metodą *in vivo* lub na podstawie częściowego zastąpienia badania w strategii badań (3).

2. Ocena podrażnień skóry wiązała się zwykle z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych [metoda badawcza B.4 równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 404 pierwotnie przyjętej w 1981 r. i zmienionej w latach 1992, 2002 i 2015] (4). Jeżeli chodzi o badanie niszczenia skóry, przyjęto trzy zweryfikowane metody badawcze *in vitro,* UE tj. metodę badawczą B.40 (równoważną metodzie badawczej OECD nr 430), metodę badawczą B.40bis (równoważną metodzie badawczej nr 431) oraz metodę badawczą B.65 (równoważną metodzie badawczej OECD nr 435) (5)(6)(7). W wytycznych OECD dotyczących zintegrowanego podejścia do badań i oceny (IATA) w odniesieniu do działania żrącego i drażniącego na skórę opisano szereg modułów, które grupują źródła informacji i narzędzia analizy oraz zapewniono wytyczne dotyczącego tego, (i) w jaki sposób zintegrować i wykorzystać istniejące dane dotyczące badań i inne dane do oceny potencjalnego działania żrącego i drażniącego na skórę substancji chemicznych oraz (ii) zaproponowano podejście, w przypadku gdy potrzebne są dalsze badania (3).

3. Niniejsza metoda badawcza odnosi się do działania drażniącego na skórę ludzką. Jej podstawę stanowi układ badawczy *in vitro* zrekonstruowanego ludzkiego naskórka (RhE), który dokładnie imituje biochemiczne i fizjologiczne właściwości górnych warstw ludzkiej skóry, tj. naskórka. Układ badawczy RhE jako źródło komórek do rekonstrukcji modelu naskórka z reprezentatywną histologią i cytoarchitekturą wykorzystuje nieprzetworzone keratynocyty pochodzenia ludzkiego. Zgodnie z zasadami wytycznej OECD nr 34 (8)(9), standardy wykonywania badań dostępne są po to, aby ułatwić walidację oraz ocenę podobnych i zmienionych metod badawczych opartych o RhE. Odpowiadającą wytyczną dotyczącą badań przyjęto pierwotnie w 2010 r., zaktualizowano w 2013 r., aby zawrzeć w niej dodatkowe modele RhE i w 2015 r., by odnieść się do wytycznych IATA oraz wprowadzić wykorzystanie alternatywnej procedury pomiaru żywotności.

4. Wstępną walidację, optymalizację oraz badania walidacyjne ukończono w odniesieniu do czterech dostępnych na rynku modeli badania *in vitro* (10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24)(25)(26)(27)(28) opartych na układzie badawczym RhE (o czułości 80 %, specyficzności 70 % oraz dokładności 75 %). Te cztery modele badania zawarto w

([1]) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

▼M8

niniejszej metodzie badawczej i wykazano w dodatku 2, który zawiera także informacje dotyczące rodzaju badania walidacyjnego wykorzystanego do zatwierdzania odpowiednich metod badawczych. Zwalidowaną metodę referencyjną, jak zauważono w dodatku 2, wykorzystano do rozwoju obecnej metody badawczej oraz standardów wykonywania badań (8).

5. Wzajemne uznawanie danych OECD będzie możliwe wyłącznie w przypadku modeli badania zweryfikowanych zgodnie ze standardami wykonywania badań (8), pod warunkiem że OECD dokonał ich przeglądu oraz je zatwierdził. Modele badań objęte niniejszą metodą badawczą oraz odpowiadającą wytyczną OECD dotyczącą badań można wykorzystywać bez wyjątku, by spełnić wymagania państw dotyczące wyników badań metod badawczych *in vitro* w odniesieniu do podrażnień skóry, korzystając jednocześnie z wzajemnego uznawania danych.

6. Definicje pojęć użytych w tym dokumencie znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

7. Ograniczeniem niniejszej metody badawczej, jak wykazano w pełnym prospektywnym badaniu walidacyjnym oceniającym i charakteryzującym metody badawcze RhE (16), jest to, że nie umożliwia ono klasyfikacji substancji chemicznych do opcjonalnej kategorii 3 GHS ONZ (lekko drażniące) (1). Obowiązujące ramy regulacyjne określą zatem sposób, w jaki w państwach członkowskich będzie się stosować niniejszą metodę badawczą określą. W przypadku UE kategorii 3 nie uwzględniono w CLP. Aby dokonać pełnej oceny miejscowego działania na skórę po pojedynczym narażeniu przez skórę, należy zapoznać się z wytycznymi OECD dotyczącymi zintegrowanych podejść do badań i oceny (3). Uznaje się, że zastosowanie ludzkiej skóry podlega krajowym i międzynarodowym zastrzeżeniom i warunkom etycznym.

8. Niniejsza metoda badawcza odnosi się do działania drażniącego na skórę ludzką. Pomimo że niniejsza metoda badawcza nie zapewnia wystarczających informacji na temat działania żrącego na skórę, należy zauważyć, że metoda badawcza B.40bis (która jest równoważna wytycznej OECD dotyczącej badań nr 431) dotycząca działania żrącego na skórę opiera się również na tym samym układzie badawczym z RhE, choć z wykorzystaniem innego protokołu (6). Niniejsza metoda badawcza opiera się na modelach RhE wykorzystujących ludzkie keratynocyty, które w związku z tym w badaniach *in vitro* pełnią rolę docelowego narządu u docelowego gatunku. Ponadto bezpośrednio obejmuje ona pierwszy etap kaskady zapalnej/mechanizmu działania (uszkodzenia komórki i tkanki dające w wyniku miejscowy uraz), które występuje podczas podrażnienia skóry *in vivo*. W ramach walidacji leżącej u podstaw niniejszej metody badawczej zbadano szeroką gamę chemikaliów, a baza danych badań walidacyjnych wyniosła ogółem 58 chemikaliów (16) (18) (23). Metoda badawcza ma zastosowanie do ciał stałych, półstałych, cieczy, emulsji i wosków. Ciecze mogą być wodne lub niewodne; substancje stałe mogą być rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie. W miarę możliwości substancje stałe należy przed zastosowaniem zmielić na drobnoziarnisty proszek; żadna inna wstępna obróbka próbki nie jest wymagana. Gazów i aerozoli nie oceniano jeszcze w badaniach walidacyjnych (29). Chociaż nie można wykluczyć, że da się je badać z wykorzystaniem technologii RhE, niniejsza metoda badawcza nie pozwala na badanie gazów i aerozoli.

9. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny. Ze względu jednak na fakt, że mieszaniny obejmują szeroki zakres kategorii i składów oraz że obecnie dostępna jest niewielka ilość informacji na temat badania mieszanin, w przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania

▼M8

omawianej metody badawczej w odniesieniu do konkretnej kategorii mieszanin (np. kierując się strategią zaproponowaną przez Eskesa i in., 2012) (30)), metody tej nie należy stosować w odniesieniu do tej konkretnej kategorii mieszanin. Należy postępować z podobną ostrożnością w przypadku, gdy poszczególne klasy substancji chemicznych lub właściwości fizykochemiczne okazują się być nieodpowiednie dla niniejszej metody badawczej.

10. Badane substancje chemiczne pochłaniające światło w takim samym zakresie, jak formazan MTT, oraz badane substancje chemiczne, które są w stanie bezpośrednio obniżyć zawartość barwnika przyżyciowego MTT (do formazanu MTT), mogą zakłócać pomiary żywotności komórek i w celu korekty wymagać zastosowania przystosowanych kontroli (zob. pkt 28–34).

11. Pojedyncza seria badawcza, w skład której wchodzą trzy kontrpróby tkanek, powinna wystarczyć dla badanej substancji chemicznej, jeśli klasyfikacja jest jednoznaczna. W przypadku wyników granicznych, np. niezgodności powtarzalnych pomiarów lub średniej procentowej żywotności równej 50 ± 5 %, należy jednak rozważyć przeprowadzenie drugiej serii badawczej, jak również trzeciej w przypadku niezgodności między wynikami dwóch pierwszych serii.

ZASADA BADANIA

12. Badana substancja chemiczna jest nanoszona miejscowo na trójwymiarowy model RhE składający się z niezmienionych keratynocytów naskórka pochodzących od człowieka, które poddano hodowli w celu uzyskania wielowarstwowego, wysoce zróżnicowanego modelu ludzkiego naskórka. Model ten składa się ze zorganizowanych warstw: podstawowej, kolczystej i ziarnistej oraz z wielopoziomowej warstwy rogowej zawierającej struktury blaszkowate utworzone z lipidów wypychanych do przestrzeni międzykomórkowej, analogiczne do struktur stwierdzanych *in vivo*.

13. Sprowokowane chemicznie działanie drażniące na skórę, objawiające się głównie poprzez rumień i obrzęk, jest wynikiem kaskady wydarzeń zaczynającej się od penetracji warstwy rogowej naskórka przez substancję chemiczną, która może doprowadzić do uszkodzenia leżących głębiej warstw keratynocytów. Uszkodzone komórki mogą uwalniać mediatory zapalne lub wywołać kaskadę zapalną, która oddziałuje także na komórki skóry właściwej, zwłaszcza na komórki zrębu i śródbłonka naczyń krwionośnych. To wskutek rozszerzenia i wzrostu przepuszczalności komórek śródbłonka można zaobserwować rumień i obrzęk (29). Metody badawcze oparte na RhE w nieobecności jakiegokolwiek unaczynienia w układzie badawczym *in vitro* mierzą zdarzenia inicjujące mające miejsce w kaskadzie, np. uszkodzenie komórki/tkanki (16)(17), i jako odczyt wykorzystują żywotność komórek.

14. Żywotność komórek w modelach RhE mierzy się metodą enzymatycznej konwersji barwnika przyżyciowego MTT [bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy, błękit tiazolilowy; numer CAS 298-93-1], w niebieską sól formazanu, którą oznacza się ilościowo po ekstrakcji z tkanek (31). Substancje drażniące identyfikuje się na podstawie ich zdolności do zmniejszenia żywotności komórek poniżej określonych wartości progowych (tj. ≤ 50 % dla substancji drażniących kategorii 2 Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów / rozporządzenia CLP). W zależności od ram regulacyjnych oraz zastosowania metody badawczej, badane substancje chemiczne, które prowadzą do zachowania żywotności komórek powyżej określonego poziomu progowego, można uznać za niedrażniące (tj. > 50 % – brak kategorii).

▼**M8**

WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

15. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania dowolnego z czterech zweryfikowanych modeli badań zgodnych z niniejszą metodą badawczą (dodatek 2), laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, wykorzystując dziesięć substancji służących do wykazania biegłości wykazanych w tabeli 1. Na przykład w przypadku, gdy wykazana substancja nie jest dostępna, można użyć innej substancji, w odniesieniu do której dostępne są odpowiednie dane porównawcze z badań *in vivo* i *in vitro* (np. z wykazu referencyjnych substancji chemicznych (8)), pod warunkiem zastosowania tych samych kryteriów wyboru, które opisano w tabeli 1. Należy uzasadnić wykorzystanie alternatywnej substancji służącej do wykazania efektywności.

16. W ramach wykazywania efektywności zaleca się, aby użytkownicy sprawdzili właściwości bariery cechujące tkanki po ich otrzymaniu, zgodnie ze wskazaniami producenta modelu RhE. Jest to szczególnie istotne, jeżeli tkanki są wysyłane na duże odległości lub wysyłka trwa długo. Gdy metoda badawcza została z powodzeniem wprowadzona oraz nabyto i wykazano jej efektywność, weryfikacja taka nie będzie konieczna w ramach rutynowej procedury. W przypadku rutynowego zastosowania metody zaleca się jednak, aby w dalszym ciągu oceniać właściwości bariery w regularnych odstępach czasu.

Tabela 1

Substancje służące do wykazania biegłości ([1])

Substancja	NR CAS	Wynik *in vivo* ([2])	Stan skupienia	Kategoria wg GHS ONZ
SUBSTANCJE NIESKLASYFIKOWANE (brak kategorii GHS ONZ)				
kwas 1-naftylooctowy	86-87-3	0	Stały	Brak kategorii
izopropanol	67-63-0	0,3	Ciecz	Brak kategorii
stearynian metylu	112-61-8	1	Stały	Brak kategorii
maślan heptylu	5870-93-9	1,7	Ciecz	Brak kategorii *(Opcjonalnie kat. 3)* ([3])
salicylan heksylu	6259-76-3	2	Ciecz	Brak kategorii *(Opcjonalnie kat. 3)* ([3])
SUBSTANCJE SKLASYFIKOWANE (kategoria 2 wg GHS ONZ)				
aldehyd cyklamenu	103-95-7	2,3	Ciecz	Kategoria 2
1-bromoheksan	111-25-1	2,7	Ciecz	Kategoria 2
Wodorotlenek potasu (5 % roztwór wodny)	1310-58-3	3	Ciecz	Kategoria 2
1-metylo-3-fenylo-1-piperazyna	5271-27-2	3,3	Stały	Kategoria 2
heptanal	111-71-7	3,4	Ciecz	Kategoria 2

([1]) Substancje służące do wykazania biegłości stanowią podzbiór substancji wykorzystanych w badaniu walidacyjnym, a ich wybór opiera się na następujących kryteriach; (i) substancje chemiczne są dostępne na rynku; (ii) są reprezentatywne dla pełnego zakresu skali podrażnienia wg Draize'a (od niedrażniących po silnie drażniące); (iii) mają określoną budowę chemiczną; (iv) są reprezentatywne dla funkcjonalności chemicznej wykorzystywanej w procesie walidacji (v) dostarczyły one odtwarzalne wyniki *in vitro* w wielu badaniach oraz laboratoriach; (vi) przewidziano je w sposób prawidłowy metodą *in vitro*, oraz (vii) nie wykazują wysoce toksycznych właściwości (np. nie są rakotwórcze ani toksyczne dla układu rozrodczego) i nie wiążą się z nadmiernymi kosztami usuwania pozostałości.

([2]) Ocena *in vivo* zgodnie z metodą badawczą B.4 (4).

([3]) Zgodnie z niniejszą metodą badania opcjonalna kategoria 3 GHS ONZ (lekko drażniące) (1) jest uznawana za brak kategorii.

▼M8

PROCEDURA

17. Poniższe stanowi opis składowych i procedur metody badawczej RhE służących ocenie podrażnień skóry (aby zapoznać się z parametrami powiązanymi z każdym modelem badania, zob. również dodatek 3). Dostępne są standardowe procedury operacyjne dla czterech modeli zgodnych z niniejszą metodą badawczą (32)(33)(34)(35).

ELEMENTY METODY BADAWCZEJ RHE

Warunki ogólne

18. W celu odtworzenia nabłonka należy użyć niezmienionych keratynocytów pochodzących od człowieka. Pod zachowującą funkcje życiowe warstwą rogową naskórka powinno znajdować się kilka warstw żywych komórek nabłonka (warstwa podstawna, warstwa kolczysta, warstwa ziarnista). Warstwa rogowa naskórka powinna być wielopoziomowa i powinna zawierać lipidy niezbędne do utworzenia czynnościowej bariery na tyle wytrzymałej, aby uniemożliwiała szybkie przenikanie cytotoksycznych wzorcowych substancji chemicznych, np. soli sodowej siarczanu dodecylu (SDS) lub markera Triton X-100. Funkcję bariery należy wykazać i można ocenić albo poprzez ustalenie stężenia, w którym wzorcowa substancja chemiczna zmniejsza żywotność tkanek o 50 % (IC_{50}) po ustalonym czasie narażenia na działanie, albo poprzez ustalenie czasu narażenia na działanie potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % (ET_{50}) po zastosowaniu wzorcowej substancji chemicznej w określonym, stałym stężeniu. Właściwości izolacyjne modelu RhE powinny zapobiegać przechodzeniu materiału przez warstwę rogową naskórka do żywej tkanki, gdyż w innym razie modelowanie narażenia skóry mogłoby być niewłaściwe. Model RhE nie powinien być skażony bakteriami, wirusami, mykoplazmą ani grzybami.

Warunki funkcjonalne

Żywotność

19. Testem stosowanym do określenia ilościowego żywotności tkanki jest próba MTT (31). Komórki żywotne wytworu tkankowego RhE mogą zredukować barwnik przyżyciowy MTT do wytrąconego niebieskiego formazanu MTT, który jest później ekstrahowany z komórki przy użyciu izopropanolu (lub podobnego rozpuszczalnika). Gęstość optyczna (OD) samego rozpuszczalnika do ekstrakcji powinna być wystarczająco niska, tj. OD < 0,1. Ekstrahowany formazan MTT można określić ilościowo, stosując pomiar absorbancji wzorca (OD) albo procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC (36). Użytkownicy modelu RhE powinni zapewnić zgodność każdej partii zastosowanego modelu RhE z określonymi kryteriami kontroli ujemnej. Zakres dopuszczalności (górna i dolna granica) kontroli ujemnej wartości gęstości optycznej (w warunkach metody badania działania drażniącego na skórę) jest określony przez producentów/dostawców modelu RhE. Zakresy dopuszczalności dla czterech zatwierdzonych metod zawartych w niniejszej metodzie badawczej podano w tabeli 2. Użytkownik spektrofotometrii HPLC/UPLC powinien stosować kontrolę ujemną zakresów OD określonych w tabeli 2 jako warunku dopuszczenia kontroli ujemnej. Należy udokumentować stabilność w hodowli (uzyskiwanie podobnych wyników pomiarów żywotności) tkanki poddanej działaniu kontroli ujemnej w badanym okresie narażenia.

Tabela 2

Zakresy dopuszczalności dla kontroli ujemnej wartości OD modeli badania zawartych w niniejszej metodzie badawczej

	Dolna granica dopuszczalności	Górna granica dopuszczalności
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼M8

	Dolna granica dopuszczalności	Górna granica dopuszczalności
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Funkcja bariery

20. Warstwa rogowa naskórka i wchodzące w jej skład lipidy powinny być na tyle odporne, aby nie było możliwe szybkie przenikanie przez nie cytotoksycznych wzorcowych substancji chemicznych, np. SDS lub markera Triton X-100, według oceny na podstawie IC_{50} lub ET_{50} (tabela 3).

Morfologia

21. Badanie histologiczne modelu RhE należy przeprowadzić z wykazaniem istnienia struktury przypominającej ludzki naskórek (w tym wielopoziomowej warstwy rogowej).

Odtwarzalność

22. Wyniki dodatniej kontroli oraz ujemnych w ramach metody badawczej powinny wykazywać odtwarzalność w czasie.

Kontrola jakości (QC)

23. Model RhE należy stosować jedynie w przypadku, gdy producent lub dostawca wykaże, że każda partia wykorzystywanego modelu RhE spełnia określone kryteria zwolnienia do produkcji, spośród których najbardziej istotne są te dotyczące *żywotności* (pkt 19), *funkcji bariery* (pkt 20) i *morfologii* (pkt 21). Dane te powinny być przekazane użytkownikom metody badawczej, tak aby mogli oni uwzględnić tę informację w sprawozdaniu z badania. Zakres dopuszczalności (górna i dolna granica) IC_{50} lub ET_{50} powinien określać producent/dostawca modelu RhE. Do wiarygodnego przewidywania klasy podrażnienia można przyjąć wyłącznie wyniki uzyskane z użyciem zakwalifikowanych tkanek. Zakresy dopuszczalności czterech zweryfikowanych modeli badań zawartych w niniejszej metodzie badawczej podano w tabeli 3.

Tabela 3

Kryteria zwolnienia serii na podstawie kontroli jakości modeli badania zawartych w niniejszej metodzie badawczej

	Dolna granica dopuszczalności	Górna granica dopuszczalności
EpiSkin™ (SM) (poddawanie działaniu SDS przez 18 godzin) (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 godziny	ET_{50} = 8,7 godziny
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 godziny	ET_{50} = 10,0 godziny
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (poddawanie działaniu SDS przez 18 godzin) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej

24. Należy użyć co najmniej trzy kontrpróby dla każdej substancji badanej i kontrolnej w każdej serii badawczej. W przypadku płynnych i stałych substancji należy nanieść na skórę dostateczną ilość badanej substancji chemicznej, tak aby równomiernie pokrywała powierzchnię naskórka, unikając jednak nakładania dawki nieskończonej, tj. w zakresie od 26–83 µl/cm^2 lub mg/cm^2 (zob. dodatek 3). W przypadku stałych substancji chemicznych, przed ich naniesieniem należy zwilżyć powierzchnię naskórka wodą dejonizowaną lub destylowaną w celu polepszenia kontaktu między badaną substancją chemiczną i powierzchnią naskórka. W miarę możliwości substancje stałe powinny być badane w postaci drobnoziarnistego proszku. W niektórych przypadkach przy rozsiewaniu można wspomóc się siatką nylonową (zob. dodatek 3). Pod koniec okresu narażenia substancję badaną należy ostrożnie zmyć z powierzchni skóry roztworem buforowym lub 0,9 % NaCl. W zależności od stosowanego modelu badania RhE, okres narażenia waha się w zakresie od 15 do 60 minut, a temperatura inkubacji w zakresie od 20 do 37 °C. Te okresy narażenia na działanie i temperatury są dobrane odpowiednio dla każdej z metod badawczych RhE i dla każdego modelu badania reprezentują różne swoiste właściwości (np. funkcję ochronną) (zob. dodatek 3).

25. W każdej serii badawczej należy wykorzystać równoczesną kontrolę ujemną i kontrolę dodatnią (PC), aby wykazać, że żywotność (przy NC), funkcja ochronna i ostateczna czułość tkankowa (przy PC) mieszczą się w dopuszczalnym zakresie zdefiniowanym na podstawie danych historycznych. Proponowana PC to 5 % roztworu wodnego SDS. Zalecanymi substancjami stanowiącymi NC są woda albo sól fizjologiczna buforowana fosforanami (PBS).

Pomiary żywotności komórek

26. W związku z procedurą badawczą najważniejsze jest to, aby pomiar żywotności nie był wykonywany natychmiast po narażeniu na badaną substancję chemiczną, ale po dostatecznie długim okresie inkubacji tkanki przemytej po tej ekspozycji w świeżym podłożu. Ten okres pozwala zarówno na ustąpienie słabych działań cytotoksycznych, jak i na pojawienie się wyraźnych działań cytotoksycznych. Podczas optymalizacji dwóch modeli badania opartych na RhE, leżących u podstaw niniejszej metody badawczej (11)(12)(13)(14)(15), za optymalny okres inkubacji po poddaniu działaniu substancji chemicznej uznano 42 godziny.

27. Test MTT jest uznaną metodą ilościową, którą należy wykorzystywać do pomiarów żywotności komórek w ramach niniejszej metody badawczej. Można ją stosować do badań z użyciem trójwymiarowego wytworu tkankowego. Próbkę tkanki umieszcza się w roztworze MTT o właściwym stężeniu (np. 0,3–1 mg/ml) na 3 godziny. Komórki żywotne przekształcają MTT w niebieski formazan. Wytrącony niebieski produkt formazanowy ekstrahuje się następnie z tkanki przy użyciu rozpuszczalnika (np. izopropanolu, kwaśnego izopropanolu) i mierzy się stężenie formazanu poprzez oznaczenie OD przy długości fali 570 nm, wykorzystując filtr w paśmie maksimum ±30 nm lub poprzez wykorzystanie procedury spektrofotometrii HPLC/UPLC (zob. pkt 34) (36).

28. Właściwości optyczne badanej substancji chemicznej lub jej oddziaływanie chemiczne na MTT (np. substancje chemiczne mogą zapobiegać lub odwracać proces wytwarzania barwy, jak również powodować jego powstawanie) powodować interferencję w teście, prowadząc do błędnego oszacowania żywotności. Może tak się zdarzyć w przypadku niecałkowitego usunięcia określonej substancji badanej z tkanki przez przemywanie lub gdy substancja ta przeniknie przez naskórek. Jeśli substancja badana oddziałuje bezpośrednio na MTT (np. reduktor MTT), jest naturalnie barwna lub staje się barwna w trakcie oddziaływania na tkankę, należy zastosować dodatkowe

▼M8

kontrole w celu wykrycia i skorygowania wpływu substancji badanej na technikę pomiaru żywotności (zob. pkt 29 i 33). Szczegółowy opis korekty bezpośredniej redukcji MTT i zakłóceń przez barwniki jest dostępny w standardowych procedurach operacyjnych dotyczących trzech zatwierdzonych modeli zawartych w niniejszej metodzie badawczej (32)(33)(34)(35).

29. W celu identyfikacji bezpośrednich reduktorów MTT, każdą badaną substancję chemiczną należy dodać do świeżo przygotowanego roztworu MTT. Jeżeli mieszanina MTT zawierająca badaną substancję chemiczną zmieni barwę na niebieską/fioletową, zakłada się, że badana substancja chemiczna bezpośrednio redukuje MTT i należy przeprowadzić pogłębioną kontrolę funkcjonalną nieżywotnych tkanek RhE, stosując niezależnie pomiar absorbancji wzorca (OD) lub procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC. Do tej dodatkowej kontroli funkcjonalnej używa się martwych tkanek, które wykazują jedynie resztkową aktywność metaboliczną, ale wchłaniają badaną substancję chemiczną w podobny sposób jak tkanki żywotne. Każda substancja chemiczna redukująca MTT nanoszona jest na co najmniej dwie kontrpróby martwych tkanek, które przechodzą przez pełną procedurę badawczą, by wygenerować nieswoistą redukcję MTT (NSMTT) (32)(33)(34)(35). Pojedyncza kontrola NSMTT jest wystarczająca w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, niezależnie od liczby przeprowadzonych niezależnych badań/serii badawczych. Następnie oblicza się rzeczywistą żywotność jako odsetek żywotności tkanek uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie reduktora MTT pomniejszony o odsetek nieswoistej redukcji MTT uzyskany w wyniku narażenia martwych tkanek na działanie tego samego reduktora MTT, obliczony relatywnie względem kontroli ujemnej prowadzonej jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSMTT).

30. W celu identyfikacji potencjalnego zakłócenia przez barwne badane substancje chemiczne lub przez badane substancje chemiczne, które zabarwiają się w kontakcie z wodą lub izopropanolem, i podjęcia decyzji co do potrzeby dodatkowych kontroli, należy przeprowadzić analizę widmową badanej substancji chemicznej w wodzie (środowisko podczas narażenia) lub izopropanolu (roztwór ekstrakcyjny). Jeżeli w wodzie lub izopropanolu badana substancja chemiczna pochłania światło w zakresie 570 ±30 nm, należy przeprowadzić pogłębione kontrole z barwnikiem lub, alternatywnie, zastosować procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC, w przypadku której te kontrole nie są wymagane (zob. pkt 33 i 34). Podczas pomiaru absorbancji wzorca każda zakłócająca, barwiona badana substancja chemiczna nanoszona jest na co najmniej dwie kontrpróby żywych tkanek, które w celu uzyskania kontroli o barwie nieswoistej (NSC_{living}) podlegają pełnej procedurze badawczej, ale podczas etapu inkubacji z MTT są inkubowane z pożywką zamiast z roztworem MTT. Kontrolę NSC_{living} należy przeprowadzać równolegle z badaniem barwionej substancji chemicznej, a w przypadku wielokrotnego badania, niezależną kontrolę NSC_{living} należy przeprowadzić podczas każdego wykonanego badania (w każdej serii badawczej) z powodu naturalnej różnorodności biologicznej żywych tkanek. Następnie oblicza się rzeczywistą żywotność jako odsetek żywotności uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie zakłócającej, badanej substancji chemicznej i inkubowanych z roztworem MTT pomniejszony o odsetek tkanek nieswoistej barwie uzyskanych w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie zakłócającej badanej substancji chemicznej i inkubowanych z pożywką bez udziału MTT, w badaniu prowadzonym jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSC_{living}).

31. Badane substancje chemiczne, które zidentyfikowano jako powodujące zarówno bezpośrednią redukcję MTT (zob. pkt 29), jak i zakłócenia barwy (zob. pkt 30), będą podczas wykonywania standardowego pomiaru absorbancji (OD) wymagały również trzeciego zestawu kontroli, oprócz kontroli NSMTT i NSC_{living} opisanych w poprzednich punktach. Dzieje się tak zazwyczaj w przypadku badanych substancji chemicznych o ciemnym zabarwieniu zakłócających badanie MTT (np. niebieskich, fioletowych,

▼M8

czarnych), ponieważ, jak opisano w pkt 29, ich swoista barwa utrudnia ocenę zdolności do bezpośredniego zmniejszenia MTT. Te badane substancje chemiczne mogą wiązać się zarówno z tkankami martwymi, jak i żywymi, a zatem kontrola NSMTT może nie tylko korygować bezpośrednią redukcję MTT przez badaną substancję chemiczną, ale również zakłócenia barwy wynikające z wiązania się badanej substancji chemicznej z martwymi tkankami. Może to prowadzić do podwójnej korekty zakłóceń koloru, ponieważ kontrola NSC_{living} już koryguje zakłócenia barwy wynikające z połączenia badanej substancji chemicznej z żywymi tkankami. Aby uniknąć podwójnej korekty możliwej w przypadku zakłócenia barwy, należy przeprowadzić trzecią kontrolę nieswoistego zabarwienia martwych tkanek (NSC_{killed}). W trakcie tej dodatkowej kontroli badana substancja chemiczna nakładana jest na co najmniej dwie kontrpróby martwych kontrprób tkanek na czas narażenia, które podlegają pełnemu badaniu, ale są inkubowane z pożywką zamiast z roztworem MTT w trakcie etapu inkubacji z MTT. Pojedyncza kontrola NSC_{killed} jest wystarczająca dla każdej badanej substancji chemicznej, niezależnie od liczby przeprowadzonych niezależnych badań/analiz, lecz powinna być przeprowadzana jednocześnie z kontrolą NSMTT, i o ile to możliwe, z wykorzystaniem tej samej partii tkanki. Następnie oblicza się rzeczywistą żywotność jako odsetek żywotności tkanek uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie badanej substancji chemicznej pomniejszony o %NSMTT i $\%NSC_{living}$, powiększony o odsetek barwy nieswoistej uzyskanej w wyniku narażenia martwych tkanek na zakłócającą badaną substancją chemiczną i inkubowanych w podłożu bez MTT, obliczony relatywnie względem kontroli ujemnej przeprowadzonej jednocześnie z korygowanym badaniem ($\%NSC_{killed}$).

32. Należy zauważyć, że nieswoista redukcja MTT i nieswoiste zakłócenia barwy mogą powodować większe odczyty ekstraktu tkankowego powyżej zakresu liniowości spektrofotometru. Na tej podstawie każde laboratorium przed rozpoczęciem badania badanych substancji chemicznych do celów regulacyjnych powinno określić liniowość zakresu spektrofotometru przy użyciu formazanu MTT (CAS # 57360-69-7) pochodzącego ze źródła komercyjnego. Pomiar absorbancji wzorca (OD) z wykorzystaniem spektrofotometru jest odpowiedni do oceny bezpośrednich reduktorów MTT oraz zakłócających barwę badanych substancji chemicznych, gdy OD ekstraktów tkankowych uzyskanych za pomocą badanej substancji chemicznej bez korekty na bezpośrednią redukcję MTT lub interferencję koloru mieszczą się w liniowym zakresie spektrofotometru lub gdy nieskorygowana procentowa żywotność uzyskana za pomocą badanej substancji chemicznej wynosi już $\leq$ 50 %. Niemniej jednak wyniki badanych substancji chemicznych wytwarzających %NSMTT lub $\%NSC_{living} \geq 50$ % kontroli ujemnej powinny być przyjmowane z ostrożnością, ponieważ jest to granica odcięcia stosowana do odróżnienia substancji chemicznych sklasyfikowanych od niesklasyfikowanych (zob. pkt 36).

33. W przypadku barwionych badanych substancji chemicznych, które nie są zgodne z pomiarem absorbancji wzorca (OD) ze względu na zbyt silną interferencję z testem MTT, można zastosować alternatywną procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT (zob. pkt 34) (36). System spektrofotometrii HPLC/UPLC pozwala na rozdzielenie formazanu MTT od badanej substancji chemicznej przed jej oznaczeniem ilościowym (36). Z tego powodu kontrole NSC_{living} lub NSC_{killed} nie są nigdy wymagane, gdy wykorzystuje się spektrofotometrię HPLC/UPLC, niezależnie od badanej substancji chemicznej. Kontrole NSMTT powinny być jednak stosowane, jeżeli istnieje podejrzenie, że badana substancja chemiczna bezpośrednio redukuje MTT lub zabarwia się, który utrudnia ocenę zdolności do bezpośredniego zmniejszenia MTT (jak opisano w pkt 29). W przypadku stosowania spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT procent żywotności tkanek oblicza się jako procent MTT powierzchni piku formazanu uzyskanej z żywych tkanek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej w stosunku do piku formazanu MTT uzyskanego przy równoczesnej kontroli ujemnej. W przypadku badanych substancji chemicznych zdolnych do bezpośredniego obniżenia MTT rzeczywistą żywotność tkanek oblicza się jako odsetek żywotności tkanek uzyskanych

▼M8

w wyniku narażenia żywych tkanek na działanie badanej substancji chemicznej minus %NSMTT. Na koniec należy zauważyć, że bezpośrednie reduktory MTT, mogące również zakłócać barwę, które są zatrzymywane w tkankach po obróbce i zmniejszają MTT tak mocno, że prowadzą do OD (przy użyciu standardowego pomiaru OD) lub obszarów pików (wykorzystując spektrofotometrie UPLC/HPLC) badanych ekstraktów tkankowych, które wykraczają poza zakres liniowości spektrofotometru, nie można ocenić, chociaż oczekuje się, że będą występować tylko w bardzo rzadkich sytuacjach.

34. Spektrofotometria HPLC/UPLC może być również stosowana ze wszystkimi rodzajami badanych substancji chemicznych (barwnych, bezbarwnych, reduktorów MTT i substancji nieredukujących MTT) do pomiaru formazanu MTT (36). Z powodu zróżnicowania systemów spektrofotometrii HPLC/UPLC, należy wykazać kwalifikację systemu spektrofotometrii HPLC/UPLC przed jego zastosowaniem, aby określić ilościowo formazan MTT z ekstraktów tkankowych poprzez spełnienie kryteriów dopuszczalności zestawu standardowych parametrów kwalifikacyjnych w oparciu na kryteriach opisanych w wytycznych Agencji Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych dotyczących przemysłu walidacji metodą bioanalityczną (36)(37). Te kluczowe parametry i kryteria ich dopuszczalności przedstawiono w dodatku 4. Po spełnieniu kryteriów dopuszczalności określonych w dodatku 4, system spektrofotometrii HPLC/UPLC uznaje się za kwalifikowany i gotowy do pomiaru formazanu MTT w warunkach doświadczalnych opisanych w niniejszej metodzie badawczej.

Kryteria dopuszczalności

35. Dla każdej metody badawczej z zastosowaniem zwalidowanych serii RhE (zob. pkt 23) tkanki poddane działaniu kontroli ujemnej powinny wykazywać OD odpowiednią do jakości tkanek poddanych wszystkim etapom wysyłki i odbioru oraz wszystkim procesom protokołu badania. Wartości OD kontroli nie powinny być niższe niż dolne granice zdefiniowane na podstawie danych historycznych. Podobnie tkanki poddane działaniu PC, tj. 5 % uwodnionego SDS, powinny odzwierciedlać zdolność do reagowania na drażniącą substancję chemiczną w warunkach metody badawczej (zob. dodatek 3 oraz dalsze informacje na temat standardowych procedur operacyjnych czterech modeli badań zawartych w niniejszej wytycznej dotyczącej badań (32)(33)(34)(35)). Powiązane i właściwe miary zmienności między kontrpróbami tkanek, tj. odchylenia standardowe (SD) powinny mieścić się w granicach akceptowalnych ustalonych dla stosowanego modelu badania (zob. dodatek 3).

Interpretacja wyników i model prognozowania

36. Wartości OD uzyskane dla każdej badanej substancji chemicznej można wykorzystać do obliczenia procentowej żywotności znormalizowanej w odniesieniu do kontroli ujemnej, której żywotność ustala się na 100 %. W przypadku spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT, procent żywotności tkanek oblicza się jako procent MTT powierzchni piku formazanu uzyskanej z żywych tkanek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej w stosunku do piku formazanu MTT uzyskanego przy jednoczesnej kontroli ujemnej. Należy wyraźnie zdefiniować i udokumentować wartość odcięcia procentowej żywotności komórek, odróżniającą drażniące substancje badane od niesklasyfikowanych substancji badanych, oraz procedury statystyczne stosowane do oceny wyników i identyfikacji substancji drażniących; należy również udowodnić, że są one właściwe (aby uzyskać więcej informacji zob. standardowe procedury operacyjne modeli badania). Wartości odcięcia do predykcji działania drażniącego są podane poniżej:

▼M8

— Badaną substancję chemiczną określa się jako „wymagającą klasyfikacji i oznakowania w związku z ONZ GHS/CLP (kategorią 2 lub 1)", jeżeli średni odsetek żywotności tkanek po narażeniu i inkubacji po poddaniu działaniu substancji jest mniejszy bądź równy (≤) 50 %. Ponieważ modeli badań RhE objętych niniejszą metodą badawczą nie można rozdzielać między kategoriami ONZ GHS/CLP 1 i 2, do podjęcia decyzji w sprawie ostatecznej kwalifikacji wymagane będą dalsze informacje dotyczące działania żrącego na skórę [zob. również wytyczne OECD w sprawie IATA (3)]. W przypadku gdy badana substancja chemiczna zostanie uznana za nieżrącą (np. na podstawie metody badawczej 40, B.40bis lub B.65) oraz po narażeniu i okresie inkubacji po poddaniu działaniu substancji chemicznej wykazuje żywotność tkanek mniejszą niż 50 % lub równą (≤) zgodnie z GHS ONZ / kategorią 2 wg rozporządzenia CLP badaną substancję chemiczną uznaje się za drażniącą dla skóry.

— W zależności od ram regulacyjnych obowiązujących w państwach członkowskich, zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP, brak kategorii badaną substancję chemiczną można uznać za niedrażniącą dla skóry jeśli żywotność tkanek po narażeniu i okresie inkubacji po poddaniu działaniu substancji chemicznej wynosi ponad (>) 50 %.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

37. Dla każdej serii badawczej należy przedstawić w formie tabelarycznej, z uwzględnieniem w stosownych przypadkach danych z powtórzeń eksperymentu, dane z poszczególnych kontrprób tkanek (np. dane dotyczące wartości OD i obliczonej procentowej żywotności komórek dla każdej substancji badanej, łącznie z klasyfikacją). Ponadto należy zgłosić średnie ± odchylenie standardowe dla każdej serii badawczej. W odniesieniu do każdej substancji badanej należy zgłosić zaobserwowane interakcje z odczynnikiem MTT i z barwnymi substancjami badanymi.

Sprawozdanie z badania

38. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badane i kontrolne substancje chemiczne:

— Substancja jednoskładnikowa: dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina: opisana w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników;

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i wszelkie dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— źródło, numer partii (jeżeli dostępny);

— postępowanie z badanymi/kontrolnymi substancjami chemicznymi przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— stabilność badanej substancji chemicznej, termin przydatności lub data ponownej analizy, jeżeli są znane;

— warunki przechowywania.

Zastosowany model i protokół RhE (oraz uzasadnienie wyboru w stosownych przypadkach)

▼**M8**

Warunki badania:

— zastosowany model RhE (w tym numer partii);

— Informacje na temat wzorcowania urządzenia pomiarowego (np. *spektrofotometru*), długość fali i filtr środkowoprzepustowy (w stosownych przypadkach) stosowany do określenia ilościowego formazanu MTT oraz zakres liniowości urządzenia pomiarowego; opis metody wykorzystanej do oceny ilościowej formazanu MTT;

— opis dopuszczalności systemu spektrofotometrycznego HPLC/UPLC, w stosownych przypadkach; pełne informacje podstawowe na temat stosowanego modelu RhE, z uwzględnieniem jego efektywności. Powinno to między innymi obejmować:

i) żywotność;

ii) funkcję bariery;

iii) morfologię;

iv) odtwarzalność i predykcyjność;

v) kontrole jakości (QC) modelu;

— odniesienie do danych historycznych modelu. Powinno to między innymi obejmować dopuszczalność danych QC z odwołaniem do danych dotyczących serii historycznych;

— wykazanie biegłości w stosowaniu metody badawczej przed rutynowym użyciem w drodze badania substancji służących do wykazania biegłości.

Procedura badawcza:

— szczegóły wykorzystanej procedury badania (w tym procedury mycia sprzętu stosowane po okresie narażenia), dawki wykorzystanych badanych substancji chemicznych i zastosowane próby kontroli;

— czas trwania i temperatura okresu inkubacji w trakcie narażenia i po jego zakończeniu;

— wskazanie prób kontroli używanych w odniesieniu do bezpośrednich reduktorów MTT lub badanych substancji chemicznych, które w wyniku reakcji przechodzą w barwny produkt, w stosownych przypadkach;

— liczba kontrprób tkanek wykorzystanych na badaną substancję chemiczną i próbę kontroli (PC, kontrola ujemna oraz NSMTT, NSC_{living} i NSC_{killed}, w stosownych przypadkach);

— opis zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji/modelu prognozowania na podstawie wykorzystanego modelu RhE;

— Opis wszelkich modyfikacji w procedurze badawczej (w tym procedurach mycia).

Kryteria dopuszczalności badania i serii badawczej:

— średnie wartości oraz zakresy dopuszczalności dodatniej i ujemnej kontroli na podstawie danych historycznych; dopuszczalna zmienność wśród kontrprób tkanek w przypadku dodatniej i ujemnej kontroli;

▼M8

— dopuszczalna zmienność wśród kontrprób tkanek w przypadku badanej substancji chemicznej.

Wyniki:

— tabelaryczne zestawienie danych dotyczących pojedynczych badanych substancji chemicznych dla każdej serii badawczej i każdego powtarzalnego pomiaru, w tym OD lub MTT powierzchni piku formazanu, odsetka żywotności tkanek, średniego odsetka żywotności tkanek i SD;

— w stosownych przypadkach wyniki kontroli używanych w odniesieniu do bezpośrednich reduktorów MTT lub badanych substancji chemicznych, które w wyniku reakcji przechodzą w barwny produkt, w tym OD lub MTT powierzchni piku formazanu, % NSMTT, % NSC_{living}, %NSC_{killed}, SD, ostateczny właściwy odsetek żywotności tkanek;

— wyniki uzyskane z zastosowaniem badanych substancji chemicznych i kontroli w odniesieniu do określonych kryteriów dopuszczalności badania i serii badawczej;

— opis innych zaobserwowanych skutków;

— ustalona na tej podstawie klasyfikacja w odniesieniu do modelu prognozowania lub zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji.

Omówienie wyników

Wnioski

BIBLIOGRAFIA

(1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie drugie zmienione, ONZ Nowy Jork i Genewa 2013. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) EURL-ECVAM, *Statement on the Performance under UN GHS of three* In Vitro *assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards,* ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 kwietnia 2009. Dostępne na stronie internetowej: 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,* [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 203). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(4) Rozdział B.4 niniejszego załącznika, Ostre działanie drażniące na skórę.

(5) Rozdział B.40 niniejszego załącznika, *Badanie działania żrącego na skórę in vitro: Test przezskórnej oporności elektrycznej (TER).*

(6) Rozdział B.40bis niniejszego załącznika, *Badanie działania żrącego na skórę in vitro: Metoda badawcza z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka.*

(7) Rozdział B.65 niniejszego załącznika, *Metoda badawcza bariery membranowej in vitro.*

▼**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*. [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 220. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(9) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 34. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(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. i Botham, P. (2001). *A Prevalidation Study on* In Vitro *Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team,* „Toxicol. *in Vitro*" nr 15, s. 57–93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. i 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" nr 16, s. 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. i Spielmann, H. (2004). *Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on In Vitro Skin Irritation Tests*, „ALTEX" nr 21, s. 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. i 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" nr 33, s. 351–367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. i 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" nr 33, s. 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. i 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" nr 30, s. 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. i 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" nr 35, s. 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. i Zuang, V. (2007). *The ECVAM International Validation Study on* In Vitro *Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals*, „ATLA" nr 35, s. 603–619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. i 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" nr 14, s. 351–358.

▼**M8**

(20) EURL-ECVAM (2007). *Statement on the Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation,* ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 kwietnia 2007. Dostępne na stronie internetowej: 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. Uwaga: Są to pierwotne PS wykorzystane w celu walidacji dwóch metod badawczych. Nie należy już stosować tych PS, ponieważ obecnie dostępna jest zaktualizowana wersja (8).*

(22) EURL-ECVAM (2008). *Statement on the Scientific Validity of* In Vitro *Tests for Skin Irritation Testing*, ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 listopada 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*. [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 137, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. i 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*, „Toxicol Sci" nr 34, s. 327–334.

(25) Katoh, M. i Hata K. (2011). *Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439*, „AATEX" nr 16, s. 111–122.

(26) OECD (2011). *Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24*, [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 159). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(27) OECD (2011). *Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24*, [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 155). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(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. i Omori, T. (2012). *Validation Study of the In Vitro Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24*, „Altern Lab Anim" nr 40, s. 33–50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. i Schröder, K.R. (2004). In Vitro *Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models*, „Toxicol. In Vitro" nr 18, s. 231–243.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. „Regulatory Toxicology and Pharmacology" nr 62, s. 393–403.

(31) Mosmann, T. (1983). *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*, „J. Immunol. Methods" nr 65, s. 55–63.

▼**M8**

(32) EpiSkin™ (luty 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™ (zmienione, marzec 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 SOP (luty 2009) *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 (czerwiec 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., i 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.* Tekst w przygotowaniu.

(37) US FDA (2001). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.* U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, maj 2001. Dostępne na stronie internetowej: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K. i Maibach, H.I. (1995). *Irritant Contact Dermatitis*, [w]: „Practical Contact Dermatitis", s. 7–18 (red. J.D. Guin). Mc Graw-Hill, Nowy Jork.

(39) EURL-ECVAM (2009). *Performance Standards for In Vitro Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). Uwaga: Jest to obecna wersja PS ECVAM, zaktualizowana w 2009 r. w celu wdrożenia GHS ONZ. Nie należy już stosować tych PS, ponieważ obecnie dostępna jest zaktualizowana wersja (8) odnosząca się do obecnej wytycznej dotyczącej badań.*

(40) EURL-ECVAM (2009). *ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for In Vitro Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis*, ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 lipca 2009.

(41) Komisja Europejska, Dyrektywa Komisji 2001/59/WE z dnia 6 sierpnia 2001 r. dostosowująca do postępu technicznego po raz dwudziesty ósmy dyrektywę Rady 67/548/EWG w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych, dotyczących klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych, Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej L 225, s. 1.

▼**M8**

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności wyników zastosowanej metody badawczej z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na określenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (9).

Żywotność komórek: parametr określający całkowitą aktywność populacji komórek, np. zdolność dehydrogenaz w mitochondriach komórek do obniżenia zawartości barwnika przyżyciowego MTT, (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy) który, w zależności od pomiaru końcowego i zastosowanego schematu badania odpowiada całkowitej liczbie lub żywotności komórek.

Substancja chemiczna: oznacza substancję lub mieszaninę.

Zgodność: jest to miara efektywności w odniesieniu do modeli badania, które dają wyniki kategoryczne i jest jednym z aspektów istotności. To określenie jest czasami stosowane wymiennie z określeniem „dokładność"; definiuje się jako odsetek wszystkich badanych substancji chemicznych, które są prawidłowo sklasyfikowane jako dodatnie lub ujemne. Zgodność jest w dużym stopniu uzależniona od przewagi dodatnich wyników w rodzajach badanej substancji chemicznej (9).

ET_{50}: może być oszacowane przez ustalenie czasu narażenia na działanie potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % po zastosowaniu wzorcowej substancji chemicznej w określonym, stałym stężeniu, zob. również IC_{50}.

GHS (Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ)): system obejmujący klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki, mające informować na temat szkodliwego działania tych substancji chemicznych w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) oraz środowiska (1).

HPLC: wysokosprawna chromatografia cieczowa.

IATA: zintegrowane podejście do badań i oceny

IC_{50}: może być oszacowane w drodze ustalenia stężenia, w którym wzorcowa substancja chemiczna powoduje zmniejszenie żywotności tkanek o 50 % (IC_{50}) po stałym czasie narażenia na działanie, zob. również ET_{50}.

Dawka nieskończona: ilość substancji badanej nakładana na skórę, przekraczająca ilość konieczną do całkowitego, jednolitego pokrycia jej powierzchni.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji.

Substancja jednoskładnikowa: substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

▼M8

MTT: bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy MTT.

Substancja wieloskładnikowa: substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu ≥ 10 % (w/w) i < 80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się w wyniku zmieszania co najmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

NSC_{killed}: barwa nieswoista martwych tkanek.

NSC_{living}: barwa nieswoista żywych tkanek.

NSMTT: nieswoista redukcja MTT.

Standardy wykonywania badań: normy oparte na zwalidowanej metodzie badania, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badawczej, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: (i) zasadnicze elementy metody badawczej; (ii) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania dopuszczalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz (iii) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badania, który proponowana metoda badania powinna osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia (9).

PC: Kontrola dodatnia – kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badania (9).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej (9).

Badanie zastępcze: badanie, które ma na celu zastąpienie badania stosowanego rutynowo i zaakceptowanego do identyfikacji zagrożeń i/lub oceny ryzyka i w odniesieniu do którego ustalono, że zapewnia równoważną lub lepszą ochronę zdrowia ludzi lub zwierząt lub środowiska, odpowiednio, w porównaniu z zaakceptowanym badaniem, we wszystkich możliwych warunkach badania i w odniesieniu do wszystkich możliwych chemikaliów (9).

Seria badawcza: seria badawcza obejmuje przynajmniej jedną badaną substancję chemiczną, która badana jest równocześnie z kontrolą ujemną i kontrolą dodatnią.

Czułość: odsetek wszystkich dodatnich/aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki kategoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (9).

▼**M8**

Badanie *in vivo* działania drażniącego na skórę: powodowanie odwracalnego uszkodzenia skóry w wyniku nałożenia na skórę badanej substancji chemicznej na okres do 4 godzin. Działanie drażniące na skórę jest powstającą miejscowo reakcją badanej tkanki skóry i pojawia się wkrótce po stymulacji (38). Jest ono spowodowane miejscową reakcją zapalną związaną z wrodzoną (nieswoistą) odpowiedzią układu odpornościowego tkanki skóry. Jego główną cechą jest odwracalny proces obejmujący reakcje zapalne oraz większość charakterystycznych objawów klinicznych podrażnienia (rumień, obrzęk, świąd i ból) związanych z procesem zapalnym.

Swoistość: odsetek wszystkich negatywnych/nieczynnych badanych chemikaliów prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki kategoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (9).

Substancja: pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UPLC: Ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

▼**M8**

Dodatek 2

MODELE BADANIA UWZGLĘDNIONE W NINIEJSZEJ METODZIE BADAWCZEJ

Nr	Nazwa modelu badania	Rodzaj badania walidacyjnego	Źródła
1	EpiSkin™	Pełne prospektywne badanie walidacyjne (2003–2007). Elementy tego modelu zostały wykorzystane do określenia istotnych elementów metody badania pierwotnej i zaktualizowanej ECVAM PS (39)(40)(21) (*). Ponadto dane metody odnoszące się do identyfikacji substancji niesklasyfikowanych i sklasyfikowanych stanowiły główną podstawę do określenia swoistości i czułości pierwotnych PS (*).	(2)(10)(11)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(23)(32)(39)(40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*pierwotna*): Początkowo model badania przeszedł pełną prospektywną walidację wraz z numerem 1. z lat 2003–2007. Elementy tego modelu zostały wykorzystane do określenia istotnych elementów metod badania pierwotnej i zaktualizowanej ECVAM PS (39)(40)(21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Modyfikacja pierwotnego EpiDerm™ została zweryfikowana przy użyciu pierwotnej ECVAM PS (21) w 2008 r. (*)	(2)(10)(12)(13)(15)(16)(17)(18)(20)(21)(23)(33)(39)(40) (2)(21)(22)(23)(33)
3	SkinEthic™ RHE	Badanie walidacyjne na podstawie pierwotnych standardów wykonywania badań ECVAM (21) w 2008 r. (*)	(2)(21)(22)(23)(31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Badanie walidacyjne (2011–2012) na podstawie standardów wykonywania badań (PS) wytycznej dotyczącej badań OECD nr 439 (8) opartych na zaktualizowanej ECVAM PS (*) (39)(40).	(24)(25)(26)(27)(28)(35)(39)(40) oraz PS tej wytycznej dotyczącej badań (8) (*)

(*) Pierwotne standardy wykonywania badań ECVAM (PS) (21) zostały opracowane w 2007 r. po zakończeniu prospektywnego badania walidacyjnego (16), w ramach którego oceniono efektywność modeli badania nr 1 i 2 w odniesieniu do systemu klasyfikacji opisanego w poprawce 28 do dyrektywy UE w sprawie substancji niebezpiecznych (41). W 2008 r. wprowadzono GHS ONZ (1) i unijnego rozporządzenia CLP, skutecznie przesuwając wartość graniczną dla odróżnienia substancji niesklasyfikowanych od substancji sklasyfikowanych z oceny *in vivo* 2,0 do 2,3. Aby dostosować się do tego zmienionego wymogu regulacyjnego, w 2009 r. zaktualizowano wartości dokładności i wykaz chemicznych substancji odniesienia ECVAM PS (2)(39)(40). Podobnie jak pierwotne PS, również uaktualnione PS były w dużej mierze oparte na danych z modeli nr 1 i 2 (16), ale dodatkowo wykorzystywały dane dotyczące chemicznych substancji odniesienia z modelu nr 3. W 2010 r. zaktualizowane ECVAM PS zostały wykorzystane do określenia PS związanych z tą wytyczną dotyczącą badań (8). Dla celów niniejszej metody badawczej EpiSkin™ jest uważany za zwalidowaną metodę referencyjną, ponieważ został wykorzystany do opracowania wszystkich kryteriów PS. Szczegółowe informacje na temat badań walidacyjnych, zestawienie wygenerowanych danych, jak również tło dla niezbędnych dostosowań PS w wyniku wdrożenia GHS ONZ / rozporządzenia CLP można znaleźć w wyjaśniającym dokumencie bazowym ECVAM/BfR do odpowiedniej wytycznej dotyczącej badań OECD nr 439 (23).

SIT: Badanie działania drażniącego na skórę

RHE: Zrekonstruowany ludzki naskórek

▼**M8**

Dodatek 3

PARAMETRY PROTOKOŁU SPECYFICZNE DLA KAŻDEGO Z MODELI BADANIA UWZGLĘDNIONYCH W NINIEJSZEJ METODZIE BADAWCZEJ

Modele RhE wykazują bardzo podobne protokoły i wszystkie wykorzystują okres po inkubacji o długości 42 godzin (32)(33)(34)(35). Zmiany dotyczą głównie trzech parametrów związanych z różnymi funkcjami ochronnymi modeli badania i wymienionych tutaj: A) czas i objętość inkubacji wstępnej, B) podawanie badanych substancji chemicznych i C) objętość po inkubacji.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Inkubacja wstępna				
Czas inkubacji	18–24 godzin	18–24 godzin	< 2 godzin	15–30 godzin
Objętość pożywki	2 ml	0,9 ml	0,3 lub 1 ml	0,5 ml
B) Podanie badanej substancji chemicznej				
Dla cieczy	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Dla substancji stałych	10 mg (26 mg/cm^2) + DW (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DW (25 µl)
Zastosowanie siatki nylonowej	Nie stosuje się	W razie potrzeby	Stosuje się	Nie stosuje się
Całkowity czas podawania	15 minut	60 minut	42 minuty	15 minut
Temperatura podawania	RT	a) w RT przez 25 minut b) w 37 °C przez 35 minut	RT	RT
C) Objętość po inkubacji				
Objętość pożywki	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Maksymalna dopuszczalna zmienność				
Odchylenie standardowe pomiędzy kontrpróbami tkanek	SD18	SD18	SD18	SD18

RT: temperatura pokojowa
DW: woda destylowana
DPBS: roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami Dulbecco

▼**M8**

Dodatek 4

KLUCZOWE PARAMETRY I KRYTERIA DOPUSZCZALNOŚCI SYSTEMU SPEKTROFOTOMETRYCZNEGO HPLC/UPLC DO POMIARU FORMAZANU MTT POBRANEGO Z TKANEK RHE

Parametr	Protokół wyprowadzony z Wytycznej FDA (36)(37)	Kryteria dopuszczalności
Selektywność	Analiza izopropanolu, ślepej próby z żywymi tkankami (izopropanolu pobranego z żyjących tkanek RhE niepoddanych działaniu jakichkolwiek substancji), ślepej próby z martwymi tkankami (izopropanolu pobranego z martwych tkanek RhE niepoddanych działaniu jakichkolwiek substancji)	$Obszar_{interferencja} \leq 20\ \%\ Obszar_{LLOQ}$ (1)
Precyzja	Kontrole jakości (np. formazan MTT przy 1,6 µg/ml, 16 µg/ml oraz 160 µg/ml) w izopropanolu (n = 5)	CV ≤ 15 % lub ≤ 20 % w odniesieniu do LLOQ
Dokładność	Kontrole jakości w izopropanolu (n = 5)	% Dev ≤ 15 % lub ≤ 20 % w odniesieniu do LLOQ
Efekt matrycy	Kontrole jakości na żywej ślepej próbie (n = 5)	85 % ≤ efekt macierzysty % ≤ 115 %
Środek przeniesiony	Analiza izopropanolu według normy ULOQ (2)	$Obszar_{interferencja} \leq 20\ \%\ Obszar_{LLOQ}$
Odtwarzalność (śródzienna)	3 niezależne krzywe wzorcowe (na podstawie 6 kolejnych roztworów 1/3 formazanu MTT w izopropanolu, poczynając od ULOQ, np. 200 µg/ml); Kontrole jakości w izopropanolu (n = 5)	Krzywe kalibracyjne: % Dev ≤ 15 % lub ≤ 20 % w odniesieniu do LLOQ Kontrole jakości: % Dev ≤ 15 % oraz CV ≤ 15 %
Odtwarzalność (między kolejnymi dniami)	Dzień 1: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3) Dzień 2: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3) Dzień 3: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3)	
Krótkookresowa stabilność formazanu MTT w ekstrakcie tkankowym RhE	Kontrole jakości na żywej ślepej próbie (n = 3) analizowane w dniu przygotowania oraz po 24 godzinach składowania w temperaturze pokojowej	% Dev ≤ 15 %
W razie potrzeby – długookresowa stabilność formazanu MTT w ekstrakcie tkankowym RhE	Kontrole jakości w żywej ślepej próbie (n = 3) analizowane w dniu przygotowania oraz po kilku dniach przechowywania w określonej temperaturze (np. 4 °C, -20 °C, -80 °C)	% Dev ≤ 15 %

(1) LLOQ: Dolna granica oznaczalności określona tak, by obejmowała 1-2 % żywotności tkanek, tj. 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ: Górna granica oznaczalności określona tak, by była co najmniej dwukrotnie wyższa niż najwyższe oczekiwane stężenie formazanu MTT w ekstraktach izopropanolu z kontroli ujemnych 200 µg/ml.

▼M7

B.47. **METODA BADANIA ZMĘTNIENIA I PRZEPUSZCZALNOŚCI ROGÓWKI U BYDŁA DO CELÓW IDENTYFIKACJI (I) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH POWODUJĄCYCH POWAŻNE USZKODZENIE OCZU ORAZ (II) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH, KTÓRE NIE WYMAGAJĄ ZAKLASYFIKOWANIA JAKO SUBSTANCJE DRAŻNIĄCE OCZY LUB POWODUJĄCE POWAŻNE USZKODZENIE OCZU**

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 437 (2013). Metoda badania zmętnienia i przepuszczalności rogówki u bydła (BCOP) została oceniona przez Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) przy udziale Europejskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM) i Japońskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (JaCVAM) w latach 2006 i 2010 (1)(2). W ramach pierwszej oceny metodę badawczą BCOP oceniono pod kątem użyteczności do celów identyfikowania substancji chemicznych (substancji i mieszanin) powodujących poważne uszkodzenie oczu (1). W ramach drugiej oceny metodę badawczą BCOP oceniono pod kątem użyteczności do celów identyfikowania substancji chemicznych (substancji i mieszanin) niesklasyfikowanych jako powodujące podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu (2). Baza danych służących do walidacji BCOP zawierała łącznie 113 substancji i 100 mieszanin (2) (3). Na podstawie tych ocen oraz ich wzajemnej oceny stwierdzono, że ta metoda badawcza może prawidłowo identyfikować substancje chemiczne (zarówno substancje, jak i mieszaniny) powodujące poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1), jak również substancje chemiczne, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje powodujące podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu, określone przez Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ) (4) oraz rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP) ([1]), w związku z czym została zatwierdzona jako potwierdzona naukowo do obu celów. Poważne uszkodzenie oczu to uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie jest w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Badane substancje chemiczne powodujące poważne uszkodzenie oczu są zaklasyfikowane do kategorii 1 wg GHS ONZ. Substancje chemiczne niesklasyfikowane jako powodujące podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu, definiuje się jako te substancje, które nie spełniają wymogów zaklasyfikowania jako należące do kategorii 1 lub 2 (2A lub 2B) wg GHS ONZ, tj. określa się je jako nienależące do żadnej kategorii – brak kategorii wg GHS ONZ. Niniejsza metoda badawcza obejmuje zalecane stosowanie i ograniczenia metody badawczej BCOP oparte na jej ocenach. Główne różnice między pierwotną wersją wytycznych OECD dotyczących badań z 2009 r. a zaktualizowaną wersją z 2013 r. odnoszą się m.in. do: stosowania metody badawczej BCOP w celu identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają sklasyfikowania według GHS ONZ (pkt 2 i 7); wyjaśnień dotyczących stosowania metody badawczej BCOP do badania alkoholi, ketonów i substancji stałych (pkt 6 i 7) oraz substancji i mieszanin (pkt 8); wyjaśnień dotyczących zalecanego sposobu badania środków powierzchniowo czynnych i mieszanin zawierających takie środki (pkt 28); aktualizacji i wyjaśnień dotyczących kontroli dodatniej (pkt 39 i 40); aktualizacji kryteriów podejmowania decyzji w metodzie badawczej BCOP (pkt 47); aktualizacji kryteriów dopuszczalności badania (pkt 48); aktualizacji elementów sprawozdania z badania (pkt 49); aktualizacji dodatku 1 zawierającego definicje; dodania dodatku 2 dotyczącego zdolności predykcyjnej metody badawczej BCOP w różnych systemach klasyfikacji; aktualizacji dodatku 3 zawierającego wykaz substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości; oraz aktualizacji dodatku 4 dotyczącego pojemnika na rogówkę w badaniu BCOP (pkt 1) oraz przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki (pkt 2 i 3).

([1]) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

▼M7

Obecnie powszechnie uznaje się, że w dającej się przewidzieć przyszłości żaden pojedynczy test działania drażniącego na oko *in vitro* nie będzie w stanie zastąpić testu działania drażniącego na oko *in vivo* wg Draize'a na potrzeby prognozowania pełnego zakresu działania drażniącego różnych klas chemicznych. Strategiczne połączenia kilku alternatywnych metod badawczych w ramach (zintegrowanej) strategii badań mogą jednak być w stanie zastąpić test działania drażniącego na oko wg Draize'a (5). Podejście odgórne (5) ma w założeniu być stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna będzie miała wysoki potencjał działania drażniącego, podejście oddolne (5) ma być natomiast stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna nie spowoduje podrażnienia oczu w stopniu wymagającym zaklasyfikowania jej jako substancji drażniącej dla oczu. Metoda badawcza BCOP jest metodą badawczą *in vitro*, którą można stosować w niektórych okolicznościach i przy określonych ograniczeniach do celów klasyfikacji i oznakowania substancji chemicznych pod względem zagrożeń dla oczu. Chociaż uważa się, że metoda badawcza BCOP nie może samodzielnie zastąpić badania na oku królika *in vivo*, jest ona zalecana jako pierwszy etap w strategii badań, takiej jak podejście odgórne zaproponowane przez Scotta *et al.* (5) na potrzeby identyfikacji substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu, tj. substancji chemicznych, które należy zaklasyfikować do kategorii 1 wg GHS ONZ bez dalszych badań (4). Metoda badawcza BCOP jest również zalecana do celów identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu zgodnie z GHS ONZ (brak kategorii wg GHS ONZ) (4), w ramach strategii badań takiej jak podejście oddolne (5). Konieczne będzie jednak przeprowadzenie dodatkowego badania (*in vitro* lub *in vivo*) w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której nie przewiduje się, żeby powodowała poważne uszkodzenie oczu, ani której nie zaklasyfikowano do substancji powodujących podrażnienie/poważne uszkodzenie oczu w ramach metody badawczej BCOP w celu ustanowienia ostatecznej klasyfikacji.

Niniejsza metoda badawcza ma na celu opisanie procedur stosowanych do oceny potencjalnego działania szkodliwego dla oczu badanej substancji chemicznej, określanego na podstawie potencjału wywoływania przez tę substancję zmętnienia i zwiększonej przepuszczalności w izolowanej rogówce bydlęcej. Efekty toksyczne dla rogówki są oceniane na podstawie: (i) zmniejszonej przepuszczalności światła (zmętnienie) oraz (ii) zwiększonej przepuszczalności barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny (przepuszczalność). Oceny zmętnienia i przepuszczalności rogówki w następstwie narażenia rogówki na badaną substancję są łączone w celu wyprowadzenia oceny punktowej działania drażniącego *in vitro*, którą wykorzystuje się do klasyfikowania stopnia działania drażniącego badanej substancji.

Definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

Niniejsza metoda badawcza opiera się na protokole metody badawczej BCOP ICCVAM (6)(7), który pierwotnie opracowano na podstawie informacji uzyskanych z instytutu badań *in vitro* (Institute for In Vitro Sciences, IIVS) oraz na protokole 124 INVITTOX (8), który został zastosowany w sponsorowanym przez Wspólnotę Europejską badaniu prewalidacyjnym przeprowadzonym w latach 1997–1998. Podstawą dla obydwu powyższych protokołów była metoda badawcza BCOP, o której po raz pierwszy wspomina Gautheron *et al.* 9).

Metodę badawczą BCOP można wykorzystać do identyfikowania substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu zgodnie z GHS ONZ, tj. substancji chemicznych zaklasyfikowanych do kategorii 1 wg GHS ONZ (4). W przypadku wykorzystywania metody badawczej BCOP do tego celu metoda ta wykazuje ogólną dokładność na poziomie 79 % (150/191), odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie 25 % (32/126) oraz odsetek wyników fałszywie ujemnych na poziomie 14 % (9/65) w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badawczej na oku królika *in vivo*, sklasyfikowanych zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ (3) (zob. dodatek 2, tabela 1). W przypadku wykluczenia z bazy danych badanych substancji chemicznych należących do określonych klas chemicznych (tj. alkohole, ketony) lub fizycznych (tj. substancje stałe) ogólna dokładność metody badawczej BCOP wynosi 85 % (111/131), odsetek wyników fałszywie dodatnich wynosi 20 % (16/81), a odsetek wyników fałszywie ujemnych wynosi 8 % (4/50) zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ (3). Potencjalne wady metody badawczej BCOP w przypadku stosowania tej metody do identyfikowania substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (substancji zaklasyfikowanych do kategorii 1 wg GHS ONZ) opierają się na wysokich odsetkach wyników fałszywie dodatnich w przypadku alkoholi i ketonów oraz na wysokim odsetku wyników fałszywie

▼M7

ujemnych w przypadku substancji stałych, które to wyniki obserwuje się w bazie danych służących do walidacji (1)(2)(3). Ponieważ jednak metoda badawcza BCOP nie prowadzi do zawyżania wyników w odniesieniu do wszystkich alkoholi i ketonów, a niektóre z tych substancji są prawidłowo klasyfikowane na podstawie prognoz jako należące do kategorii 1 wg GHS ONZ, tych dwóch organicznych grup funkcyjnych nie wyklucza się z dziedziny zastosowania tej metody badawczej. To użytkownik niniejszej metody badawczej powinien zdecydować, czy można zaakceptować możliwe zawyżenie wyników dotyczących alkoholu lub ketonu lub czy należy przeprowadzić dalsze badania zgodnie z podejściem opartym na analizie wagi dowodów. Jeżeli chodzi o odsetek wyników fałszywie ujemnych w przypadku substancji stałych, należy zauważyć, że substancje stałe mogą prowadzić do zmiennych i ekstremalnych warunków narażenia w teście działania drażniącego na oko *in vivo* wg Draize'a, co z kolei może skutkować nietrafnymi prognozami ich rzeczywistego potencjału działania drażniącego (10). Należy również zauważyć, że żaden z wyników fałszywie ujemnych wskazanych w bazie danych służących do walidacji ICCVAM (2)(3) w kontekście identyfikacji substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ) nie dał oceny punktowej działania drażniącego *in vitro* mniejszej niż 3 lub równej 3, co jest kryterium zidentyfikowania badanej substancji chemicznej jako nienależącej do żadnej kategorii wg GHS ONZ. Ponadto w tym kontekście odsetek wyników fałszywie ujemnych w badaniu BCOP nie ma decydującego znaczenia, ponieważ wszystkie badane substancje chemiczne, w przypadku których ocena punktowa działania drażniącego *in vitro* ma wartość większą niż 3, ale nie większą niż 55, zostaną następnie zbadane za pomocą innych odpowiednio zweryfikowanych badań *in vitro* lub w ostateczności na królikach, w zależności od wymogów regulacyjnych, przy zastosowaniu testów sekwencyjnych zgodnie z podejściem opartym na analizie wagi dowodów. Ze względu na fakt, że niektóre ze stałych substancji chemicznych są prawidłowo klasyfikowane na podstawie prognoz w ramach metody badawczej BCOP jako należące do kategorii 1 wg GHS ONZ, tego stanu skupienia również nie wyklucza się z dziedziny zastosowania niniejszej metody badawczej. Osoby przeprowadzające badanie mogą rozważyć zastosowanie niniejszej metody badawczej w odniesieniu do wszystkich rodzajów substancji chemicznych, wskutek czego ocenę punktową działania drażniącego *in vitro* o wartości powyżej 55 należy zaakceptować jako wskazującą na reakcję wywołującą poważne uszkodzenie oczu, w którym to przypadku należy daną substancję zaklasyfikować do kategorii 1 wg GHS ONZ bez dalszych badań. Jak już wspomniano, wyniki dodatnie uzyskane w przypadku alkoholi lub ketonów należy jednak interpretować z ostrożnością ze względu na potencjalne zawyżenie.

Metodę badawczą BCOP można wykorzystać również do identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu według systemu klasyfikacji GHS ONZ (4). W przypadku wykorzystywania metody badawczej BCOP do tego celu metoda ta wykazuje ogólną dokładność na poziomie 69 % (135/196), odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie 69 % (61/89) oraz odsetek wyników fałszywie ujemnych na poziomie 0 % (0/107) w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badawczej na oku królika *in vivo*, sklasyfikowanych zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ (3) (zob. dodatek 2, tabela 2). Uzyskany odsetek wyników fałszywie ujemnych (substancji chemicznych nieprzypisanych do żadnej kategorii wg GHS ONZ, które to substancje *in vivo* dają ocenę punktową działania drażniącego *in vitro* o wartości większej niż 3, zob. pkt 47) jest wysoki, ale nie ma decydującego znaczenia w tym kontekście, ponieważ wszystkie badane substancje chemiczne, w przypadku których ocena punktowa działania drażniącego *in vitro* ma wartość większą niż 3, ale mniejszą niż 55 lub równą 55, zostaną następnie zbadane za pomocą innych odpowiednio zweryfikowanych badań *in vitro* lub w ostateczności na królikach, w zależności od wymogów regulacyjnych, przy zastosowaniu testów sekwencyjnych zgodnie z podejściem opartym na analizie wagi dowodów. Metoda badawcza BCOP nie wykazuje żadnych szczególnych wad w kontekście badania alkoholi, ketonów i substancji stałych, w przypadku gdy jej celem jest identyfikacja substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ) (3). Osoby przeprowadzające badanie mogą rozważyć zastosowanie niniejszej metody badawczej w odniesieniu do wszystkich rodzajów substancji chemicznych, wskutek czego wynik ujemny (ocena punktowa działania drażniącego *in vitro* $\leq$ 3) należy zaakceptować jako wskazujący na brak konieczności zaklasyfikowania danej substancji (brak kategorii GHS ONZ). Ponieważ metoda badawcza BCOP umożliwia prawidłową identyfikację jedynie 31 % substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu, niniejszej metody badawczej nie należy wybierać w pierwszej kolejności na potrzeby inicjowania podejścia oddolnego (5), jeżeli dostępne są inne zweryfikowane i zaakceptowane metody *in vitro* o podobnie wysokiej czułości, ale większej swoistości.

▼M7

Baza danych służących do walidacji BCOP zawierała łącznie 113 substancji i 100 mieszanin (2) (3). Metoda badawcza BCOP uznawana jest zatem za mającą zastosowanie do badania zarówno substancji, jak i mieszanin.

Nie zaleca się stosowania metody badawczej BCOP do identyfikacji badanych substancji chemicznych, które należy uznać za powodujące podrażnienie oczu (kategoria 2 lub 2A wg GHS ONZ), lub badanych substancji chemicznych, które należy uznać za lekko drażniące dla oczu (kategoria 2B wg GHS ONZ), ze względu na zaniżoną klasyfikację znacznej liczby substancji chemicznych należących do kategorii 1 i uznanie ich za należące do kategorii 2, 2A lub 2B wg GHS ONZ oraz ze względu na zawyżoną klasyfikację i uznanie substancji chemicznych nieprzypisanych do żadnej kategorii wg GHS ONZ za substancje z kategorii 2, 2A lub 2B wg GHS ONZ (2) (3). W tym celu konieczne może być przeprowadzenie dodatkowego badania, z wykorzystaniem innej odpowiedniej metody.

Wszystkie procedury przeprowadzane z wykorzystaniem oczu bydlęcych i rogówki bydlęcej powinny przebiegać zgodnie z przepisami i procedurami dotyczącymi postępowania z materiałem pozyskanym od zwierząt, który obejmuje m.in. tkanki i płyny tkankowe, obowiązującymi w placówce przeprowadzającej badanie. Zaleca się przestrzeganie ogólnych środków ostrożności dla laboratoriów (11).

Chociaż w metodzie badawczej BCOP nie uwzględnia się uszkodzeń spojówki i tęczówki, metoda ta odnosi się do oddziaływania na rogówkę, co stanowi główne kryterium klasyfikacji *in vivo*, w przypadku rozważania klasyfikacji GHS ONZ. W metodzie badawczej BCOP nie można ocenić odwracalności zmian w rogówce jako takich. Na podstawie badań oczu królika zaproponowano możliwość zastosowania oceny początkowego stadium uszkodzenia rogówki w celu określenia niektórych rodzajów nieodwracalnych skutków (12). Konieczna jest jednak dodatkowa wiedza naukowa, pozwalająca zrozumieć sposób powstawania nieodwracalnych skutków niezwiązanych z pierwszym wystąpieniem poważnego uszkodzenia. Metoda badawcza BCOP nie pozwala też na ocenę potencjalnej toksyczności ogólnoustrojowej związanej z narażeniem oczu.

Niniejsza metoda badawcza będzie aktualizowana okresowo w miarę uwzględniania nowych informacji i danych. Na przykład histopatologia może być przydatna, gdy potrzebna jest bardziej szczegółowa charakterystyka uszkodzenia rogówki. Jak określono w wytycznych OECD nr 160 (13), zachęca się użytkowników do zachowywania rogówek i przygotowywania wycinków histopatologicznych, które można wykorzystać do opracowania bazy danych i kryteriów podejmowania decyzji w celu dalszego poprawienia dokładności niniejszej metody badawczej.

Każde laboratorium, które zaczyna stosować niniejszą metodę badawczą, powinno stosować substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości wymienione w dodatku 3. Laboratorium może stosować te substancje chemiczne w celu wykazania swojej biegłości technicznej w zakresie przeprowadzania metody badawczej BCOP przed przedstawieniem danych z metody badawczej BCOP do celów regulacyjnej klasyfikacji zagrożeń.

ZASADA BADANIA

Metoda badawcza BCOP jest modelem organotypowym, który zapewnia krótkotrwałe zachowanie normalnych funkcji fizjologicznych i biochemicznych rogówki bydlęcej *in vitro*. Uszkodzenia spowodowane badaną substancją chemiczną ocenia się w ramach niniejszej metody badawczej na podstawie ilościowych pomiarów zmian w zmętnieniu i przepuszczalności rogówki za pomocą odpowiednio przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki oraz spektrofotometru światła widzialnego. Obydwa pomiary stosuje się do obliczenia oceny punktowej działania drażniącego *in vitro*, na postawie której przypisuje się kategorie klasyfikacji zagrożenia podrażnieniem *in vitro* w celu przewidzenia potencjału działania drażniącego badanej substancji chemicznej na oczy *in vivo* (zob. kryteria podejmowania decyzji w pkt 48).

W metodzie badawczej BCOP stosuje się izolowaną rogówkę z oczu bydła pozyskaną bezpośrednio po uboju. Zmętnienie rogówki mierzy się ilościowo jako ilość światła przepuszczanego przez rogówkę. Przepuszczalność mierzy się ilościowo jako ilość barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny, jaka przenika

▼M7

przez całą grubość rogówki i jest wykrywana w środku komory tylnej oka. Badane substancje chemiczne aplikuje się na nabłonek rogówki poprzez dodanie ich do komory przedniej pojemnika na rogówkę. Dodatek 4 zawiera opis i rysunek pojemnika na rogówkę stosowanego w metodzie badawczej BCOP. Pojemniki na rogówkę można nabyć z różnych źródeł komercyjnych lub sporządzić samodzielnie.

Pochodzenie i wiek oczu bydlęcych oraz wybór gatunku zwierząt

Bydło wysyłane do rzeźni jest zazwyczaj poddawane ubojowi albo dla celów spożycia przez ludzi, albo dla innych celów komercyjnych. Rogówki stosowane w metodzie badawczej BCOP pochodzą wyłącznie od zdrowych zwierząt, które uznano za odpowiednie do wprowadzenia do łańcucha żywnościowego człowieka. W związku z tym, że masa bydła jest znacznie zróżnicowana w zależności od rasy, wieku i płci, nie ma zalecanej masy zwierzęcia podczas uboju.

Różnice w wymiarach rogówki mogą pojawić się w przypadku gdy stosuje się oczy pochodzące od zwierząt w różnym wieku. Rogówki o średnicy poziomej > 30,5 mm i grubości środkowej części wynoszącej ≥ 1 100 μm uzyskuje się zazwyczaj od bydła w wieku powyżej ośmiu lat, natomiast rogówki o średnicy poziomej < 28,5 mm i grubości środkowej części wynoszącej < 900 μm uzyskuje się zazwyczaj od bydła w wieku poniżej pięciu lat (14). W związku z powyższym zazwyczaj nie stosuje się oczu pochodzących od bydła w wieku powyżej 60 miesięcy. Zasadniczo nie stosuje się oczu pochodzących od bydła w wieku poniżej 12 miesięcy, ponieważ są one jeszcze w fazie rozwoju, przez co grubość i średnica rogówki są znacznie mniejsze niż w przypadku oczu dorosłego bydła. Stosowanie rogówek pochodzących od młodych zwierząt (tj. w wieku 6–12 miesięcy) jest jednak dozwolone, ponieważ wiążą się z tym pewne korzyści, na przykład: większa dostępność, wąski przedział wiekowy oraz mniejsze zagrożenie związane z potencjalnym narażeniem pracowników na gąbczastą encefalopatię bydła (15). Ze względu na to, że przydatne byłoby przeprowadzenie dalszej oceny wpływu rozmiaru lub grubości rogówki na stopień reakcji na substancje chemiczne żrące i drażniące, zachęca się użytkowników do zgłaszania szacowanego wieku lub szacowanej masy zwierząt, od których pobrano rogówki stosowane w badaniu.

Pobieranie oczu i ich transport do laboratorium

Oczy pobierają pracownicy rzeźni. Aby zminimalizować uszkodzenia mechaniczne i inne rodzaje uszkodzeń oczu, enukleację oczu należy przeprowadzać jak najszybciej po śmierci zwierzęcia, po czym oczy należy natychmiast schłodzić i utrzymywać w chłodzie podczas transportu. Aby zapobiec narażeniu oczu na potencjalnie drażniące substancje chemiczne, podczas opłukiwania głowy zwierzęcia pracownicy rzeźni nie powinni używać detergentów.

Oczy należy w całości zanurzyć w schłodzonym zbuforowanym roztworze soli Hanksa w pojemniku o odpowiednich rozmiarach i przetransportować do laboratorium w taki sposób, żeby zminimalizować możliwość pogorszenia stanu oczu lub skażenia bakteriami. Ponieważ oczy pobiera się w trakcie procesu uboju, mogą one być narażone na kontakt z krwią i innym materiałem biologicznym, w tym z bakteriami i innymi mikroorganizmami. Ważne jest zatem, aby zminimalizować ryzyko skażenia (np. umieszczając pojemnik zawierający oczy w lodzie podczas pobierania i transportowania oraz dodając antybiotyki do zbuforowanego roztworu soli Hanksa używanego do przechowywania oczu podczas transportu [np. penicyliny w ilości 100 j.m./ml i streptomycyny w ilości 100 μg/ml]).

Należy zminimalizować odstęp czasu między pobraniem oczu a użyciem rogówek w metodzie badawczej BCOP (zazwyczaj pobranie i użycie następuje tego samego dnia) oraz wykazać, że nie wpłynie on negatywnie na wyniki badania. Wyniki badania opierają się na kryteriach doboru oczu, jak również na reakcjach w ramach kontroli dodatniej i ujemnej. Wszystkie oczy wykorzystane w badaniu powinny pochodzić z tej samej grupy oczu pobranych danego dnia.

Kryteria doboru oczu wykorzystywanych w metodzie badawczej BCOP

Po dostarczeniu do laboratorium oczy są dokładnie badane pod kątem wad, m.in. zwiększonego zmętnienia, zadrapań i tworzenia nowych naczyń. Wyłącznie rogówki pochodzące z oczu niewykazujących takich wad mogą zostać wykorzystane w badaniu.

▼M7

Jakość każdej rogówki jest również oceniana na późniejszych etapach badania. Należy odrzucić te rogówki, których zmętnienie po wstępnym, jednogodzinnym okresie wyrównania stężeń przekracza siedem jednostek zmętnienia lub równoważną wartość przy badaniu przyrządem do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki, oraz użyte pojemniki na rogówkę (UWAGA: przyrząd do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki należy poddać wzorcowaniu według norm zmętnienia, które stosuje się do ustalania jednostek zmętnienia, zob. dodatek 4).

Każda grupa badana (otrzymująca badaną substancję chemiczną, stanowiąca jednoczesną kontrolę dodatnią i jednoczesną kontrolę ujemną) składa się z co najmniej trzech gałek ocznych. Trzy rogówki należy wykorzystać do kontroli ujemnej w metodzie badawczej BCOP. Ponieważ wszystkie rogówki są wycinane z całej gałki ocznej i umieszczane w komorach do przechowywania rogówki, istnieje możliwość powstania artefaktów wynikających z obróbki w odniesieniu do wartości zmętnienia i przepuszczalności poszczególnych rogówek (włączając kontrolę ujemną). Ponadto wartości zmętnienia i przepuszczalności uzyskane z rogówek służących do kontroli ujemnej są stosowane w celu skorygowania wartości zmętnienia i przepuszczalności rogówki uzyskanych w wyniku działania badanej substancji chemicznej i kontroli dodatniej w obliczeniach oceny punktowej działania drażniącego *in vitro*.

PROCEDURA

Przygotowanie oczu

Rogówki niewykazujące nieprawidłowości wycina się wraz z obwódką twardówki o szerokości 2–3 mm w celu ułatwienia dalszej obróbki, przy czym dokłada się starań, by uniknąć uszkodzenia nabłonka i śródbłonka rogówki. Izolowane rogówki umieszcza się w specjalnie zaprojektowanych pojemnikach na rogówkę, składających się z komory przedniej i tylnej, które stykają się odpowiednio z nabłonkiem i śródbłonkiem rogówki. Obydwie komory są maksymalnie wypełniane wcześniej podgrzanym podłożem Eagle'a bez czerwieni fenolowej (najpierw komora tylna), przy czym należy zapewnić, aby nie utworzyły się żadne pęcherzyki powietrza. Następnie urządzenie utrzymuje się w temperaturze 32 ± 1 °C przez co najmniej godzinę w celu zrównoważenia rogówek w pożywce i uzyskania ich normalnej aktywności metabolicznej w zakresie, w jakim jest to możliwe (temperatura na powierzchni rogówki *in vivo* wynosi w przybliżeniu 32 °C).

Po okresie wyrównania stężeń do obydwu komór dodaje się świeże, wcześniej podgrzane podłoże Eagle'a bez czerwieni fenolowej oraz pobiera się wyjściowe odczyty zmętnienia dla każdej rogówki. Odrzuca się każdą rogówkę, która wykazuje makroskopowe uszkodzenia tkanki (np. zadrapania, przebarwienia, tworzenie nowych naczyń) lub zmętnienie przekraczające siedem jednostek zmętnienia lub równoważną wartość przy badaniu przyrządem do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki, oraz użyte pojemniki na rogówkę. Co najmniej trzy rogówki wybiera się jako rogówki do kontroli ujemnej (lub kontroli z rozpuszczalnikiem). Pozostałe rogówki trafiają następnie do grupy poddawanej działaniu badanej substancji i do grupy kontrolnej dodatniej.

Ze względu na to, że pojemność cieplna wody jest wyższa od pojemności cieplnej powietrza, woda zapewnia stabilniejsze warunki temperatury dla inkubacji. Zaleca się zatem stosowanie kąpieli wodnej w celu utrzymania pojemnika na rogówkę i jego zawartości w temperaturze 32 ± 1 °C. Można jednak również zastosować inkubatory powietrzne, pod warunkiem że podejmie się środki ostrożności w celu utrzymania stabilnej temperatury (np. poprzez wcześniejsze podgrzewanie pojemników i pożywek).

Podawanie badanej substancji chemicznej

Stosuje się dwa różne protokoły poddawania działaniu substancji – jeden dla cieczy i środków powierzchniowo czynnych (stałych lub ciekłych), a drugi dla substancji stałych niebędących środkami powierzchniowo czynnymi.

Ciecze bada się w stanie nierozcieńczonym. Ciała półstałe, kremy i woski są zazwyczaj badane tak jak ciecze. Czyste środki powierzchniowo czynne bada się w stężeniu 10 % w/v w roztworze chlorku sodu o stężeniu 0,9 %, w wodzie destylowanej lub innym rozpuszczalniku, w odniesieniu do którego wykazano, że nie wpływa negatywnie na układ badawczy. Zastosowanie innych stężeń należy odpowiednio uzasadnić. Mieszaniny zawierające środki powierzchniowo czynne

▼M7

mogą być badane w stanie nierozcieńczonym lub po rozcieńczeniu do odpowiedniego stężenia – w zależności od stosownego scenariusza narażenia *in vivo*. Zastosowanie badanych stężeń należy odpowiednio uzasadnić. Narażenie rogówek na działanie cieczy i środków powierzchniowo czynnych trwa 10 minut. Zastosowanie innego czasu narażenia wymaga odpowiedniego uzasadnienia naukowego. Zob. definicja środka powierzchniowo czynnego i mieszaniny zawierającej środek powierzchniowo czynny podana w dodatku 1.

Substancje stałe niebędące środkami powierzchniowo czynnymi bada się zazwyczaj jako roztwory lub zawiesiny w stężeniu 20 % w/v w roztworze chlorku sodu o stężeniu 0,9 %, w wodzie destylowanej lub innym rozpuszczalniku, w odniesieniu do którego wykazano, że nie wpływa negatywnie na układ badawczy. W niektórych okolicznościach i po przedstawieniu odpowiedniego uzasadnienia naukowego substancje stałe również można badać w postaci czystej poprzez bezpośrednią aplikację na powierzchnię rogówki z zastosowaniem metody „otwartej komory" (zob. pkt 32). Narażenie rogówek na działanie substancji stałych trwa cztery godziny, ale podobnie jak w przypadku cieczy i środków powierzchniowo czynnych możliwe jest zastosowanie innego czasu narażenia pod warunkiem przedstawienia odpowiedniego uzasadnienia naukowego.

Można zastosować różne metody podawania badanej substancji chemicznej w zależności od jej stanu skupienia i właściwości chemicznych (np. od tego, czy jest ona substancją stałą, cieczą, cieczą lepką czy cieczą nielepką). Decydujące znaczenie ma dopilnowanie, aby nabłonek został pokryty badaną substancją chemiczną w odpowiedni sposób oraz aby odpowiednio ją usunięto w trakcie płukania. Metodę „zamkniętej komory" stosuje się zwykle w przypadku badanych substancji chemicznych będących cieczami nielepkimi i cieczami lekko lepkimi, natomiast metodę „otwartej komory" stosuje się zwykle w przypadku badanych substancji chemicznych będących cieczami częściowo lepkimi i lepkimi oraz czystymi substancjami stałymi.

W przypadku metody „zamkniętej komory" badaną substancję chemiczną w ilości wystarczającej (750 µl) do pokrycia nabłonka rogówki wprowadza się do komory przedniej przez otwory do dawkowania znajdujące się w górnej części komory, które następnie w trakcie narażenia uszczelnia się specjalnymi zatyczkami. Należy zapewnić odpowiedni czas narażenia każdej rogówki na działanie badanej substancji chemicznej.

W przypadku metody „otwartej komory" przed rozpoczęciem badania z komory przedniej usuwa się pierścień zabezpieczający okienko i szklane okienko. Kontrolna lub badana substancja chemiczna (w ilości 750 µl lub w ilości wystarczającej do całkowitego pokrycia rogówki) jest aplikowana bezpośrednio na nabłonek rogówki za pomocą mikropipety. Jeżeli trudno jest zaaplikować badaną substancję chemiczną za pomocą pipety, można tę substancję wprowadzić pod ciśnieniem do pipety wyporowej, aby ułatwić dawkowanie. Końcówkę pipety wyporowej umieszcza się w końcówce dawkującej strzykawki w celu wprowadzenia substancji do końcówki pipety wyporowej pod ciśnieniem. W miarę naciskania tłoka strzykawki tłok pipety podnosi się. Jeżeli w końcówce pipety pojawią się pęcherzyki powietrza, usuwa się badaną substancję chemiczną i proces jest powtarzany, dopóki końcówka nie zostanie napełniona bez pęcherzyków powietrza. W razie potrzeby można zastosować normalną strzykawkę (bez igły), ponieważ umożliwia ona dokładne zmierzenie ilości badanej substancji chemicznej oraz ułatwia jej aplikację na nabłonek rogówki. Po podaniu substancji szklane okienko z powrotem umieszcza się w komorze przedniej, aby przywrócić układ zamknięty.

Inkubacja po zakończeniu narażenia

Po okresie narażenia usuwa się badaną substancję chemiczną, substancję służącą do kontroli ujemnej lub substancję służącą do kontroli dodatniej z komory przedniej, zaś nabłonek przedni przemywa się co najmniej trzykrotnie (lub dopóki nie znikną wszystkie widoczne ślady badanej substancji chemicznej) przy użyciu podłoża Eagle'a (zawierającego czerwień fenolową). Do spłukiwania stosuje się pożywkę zawierającą czerwień fenolową, ponieważ na podstawie zmiany barwy czerwieni fenolowej można określić skuteczność spłukiwania badanych substancji kwasowych lub zasadowych. Rogówki przemywa się więcej niż trzy razy, jeżeli czerwień fenolowa ma w dalszym ciągu zmienioną barwę (żółtą lub fioletową)

▼M7

lub jeśli badana substancja chemiczna jest w dalszym ciągu widoczna. Po oczyszczeniu pożywki z badanej substancji chemicznej rogówki opłukuje się po raz ostatni podłożem Eagle'a (bez czerwieni fenolowej). Podłoże Eagle'a (bez czerwieni fenolowej) jest używane do ostatniego opłukania, aby zapewnić usunięcie czerwieni fenolowej z przedniej komory oka przed rozpoczęciem pomiaru zmętnienia. Następnie ponownie wypełnia się komorę przednią świeżym podłożem Eagle'a bez czerwieni fenolowej.

W przypadku cieczy lub środków powierzchniowo czynnych rogówki są inkubowane przez kolejne dwie godziny w temperaturze 32 ± 1 °C. W niektórych sytuacjach przydatne może być zastosowanie dłuższego czasu po narażeniu; należy to rozważyć indywidualnie w każdym przypadku. Rogówki wystawione na działanie substancji stałych poddaje się dokładnemu płukaniu po zakończeniu czterogodzinnego narażenia, ale nie wymagają one dodatkowej inkubacji.

Pod koniec okresu dodatkowej inkubacji w przypadku cieczy i środków powierzchniowo czynnych oraz pod koniec czterogodzinnego narażenia w przypadku substancji stałych niebędących środkami powierzchniowo czynnymi dokonuje się pomiaru zmętnienia i przepuszczalności każdej rogówki. Każdą rogówkę obserwuje się również wzrokowo i zapisuje się istotne obserwacje (np. łuszczenie się tkanki, pozostałości badanej substancji chemicznej, niejednolite zmętnienie). Powyższe obserwacje mogą mieć istotne znaczenie, ponieważ mogą znaleźć odzwierciedlenie w zmienności odczytów przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki.

Kontrolne substancje chemiczne

Każde doświadczenie obejmuje jednoczesną kontrolę ujemną lub kontrolę z rozpuszczalnikiem/nośnikiem i kontrolę dodatnią.

W przypadku badania substancji ciekłej o stężeniu 100 % w metodzie badawczej BCOP uwzględnia się jednoczesną kontrolę ujemną (np. roztwór chlorku sodu o stężeniu 0,9 % lub woda destylowana) w celu wykrycia niespecyficznych zmian w układzie badawczym i zapewnienia punktu odniesienia dla punktów końcowych badania. Dzięki uwzględnieniu kontroli ujemnej warunki badania nie powodują nieprawidłowej reakcji w postaci działania drażniącego.

W przypadku badania cieczy rozcieńczonej, środka powierzchniowo czynnego lub substancji stałej w metodzie badawczej BCOP uwzględnia się jednoczesną grupę kontrolną z rozpuszczalnikiem/nośnikiem w celu wykrycia niespecyficznych zmian w układzie badawczym i zapewnienia punktu odniesienia dla punktów końcowych badania. Stosować można jedynie rozpuszczalnik/nośnik, w odniesieniu do którego wykazano, że nie wpływa negatywnie na układ badawczy.

W każdym doświadczeniu uwzględnia się substancję chemiczną, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią, jako jednoczesną kontrolę dodatnią w celu zweryfikowania integralności układu badawczego i prawidłowości jego działania. Aby zapewnić jednak możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci działania drażniącego nie powinna być nadmierna.

Przykładowymi substancjami służącymi do kontroli dodatniej dla badanych substancji chemicznych w stanie ciekłym są etanol w stężeniu 100 % lub dimetyloformamid w stężeniu 100 %. Przykładem substancji służących do kontroli dodatniej dla badanych substancji chemicznych w stanie stałym jest imidazol o stężeniu 20 % w/v w roztworze chlorku sodu o stężeniu 0,9 %.

Wzorcowe substancje chemiczne są przydatne do oceny potencjalnego działania drażniącego na oczy nieznanych substancji chemicznych z określonej klasy chemicznej lub produktowej lub do oceny względnego potencjalnego działania drażniącego substancji drażniącej dla oczu w określonym zakresie reakcji w postaci działania drażniącego.

Pomiar punktów końcowych

Zmętnienie określa się na podstawie ilości światła przepuszczanego przez rogówkę. Zmętnienie rogówki mierzy się ilościowo za pomocą przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki, w wyniku czego otrzymuje się wartości zmętnienia mierzone na skali ciągłej.

Przepuszczalność określa się na podstawie ilości barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny, jaka przenika przez wszystkie warstwy rogówki (tj. przez nabłonek na zewnętrznej powierzchni rogówki po śródbłonek na wewnętrznej powierzchni rogówki). Do przedniej komory pojemnika na rogówkę, która styka się z nabłonkiem rogówki, dodaje się roztwór 1 ml soli sodowej fluoresceiny (odpowiednio 4

▼M7

lub 5 mg/ml w przypadku badania cieczy i środków powierzchniowo czynnych lub substancji stałych niebędących środkami powierzchniowo czynnymi), natomiast tylną komorę oka, która styka się ze śródbłonkiem rogówki, wypełnia się świeżym podłożem Eagle'a. Następnie pojemnik inkubuje się w pozycji poziomej przez 90 ± 5 min w temperaturze 32 ± 1 °C. Ilość soli sodowej fluoresceiny, jaka przedostaje się do tylnej komory, jest mierzona ilościowo za pomocą spektrofotometrii UV/VIS. Pomiary spektrofotometryczne przy długości fali 490 nm rejestruje się jako wartości gęstości optycznej (OD_{490}) lub absorbancji mierzone na skali ciągłej. Wartości przepuszczalności fluoresceiny określa się przy użyciu wartości OD_{490} otrzymanych w wyniku zastosowania spektrofotometru światła widzialnego, w którym stosuje się standardową 1-centymetrową drogę optyczną.

Można ewentualnie zastosować czytnik płytek 96-dołkowych, pod warunkiem że: (i) można ustalić zakres liniowy czytnika płytek w celu określenia wartości OD_{490} fluoresceiny oraz (ii) odpowiednia liczba próbek fluoresceiny zostanie użyta w płytce 96-dołkowej, aby otrzymać wartości OD_{490} równoważne standardowej 1-centymetrowej drodze optycznej (konieczne może być całkowite wypełnienie dołków [zwykle 360µl]).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena danych

Po skorygowaniu wartości zmętnienia i średniej przepuszczalności (OD_{490}) względem wartości zmętnienia i ujemnej kontroli wartości przepuszczalności OD_{490}, średnie wartości zmętnienia i przepuszczalności OD_{490} dla każdej badanej grupy należy połączyć w wyprowadzony empirycznie wzór w celu obliczenia oceny punktowej działania drażniącego *in vitro* (IVIS) w odniesieniu do każdej grupy badanej w następujący sposób:

IVIS = średnia wartość zmętnienia + (15 × średnia wartość przepuszczalności OD_{490})

Sina *et al.* (16) podaje, że powyższy wzór wyprowadzono w trakcie badań wewnętrznych i międzylaboratoryjnych. Dane otrzymane dla serii 36 związków w badaniu międzylaboratoryjnym poddano analizie wielowymiarowej w celu wyznaczenia równania, które najlepiej opisuje zależność między danymi *in vivo* a danymi *in vitro*. Analizę przeprowadzili naukowcy w dwóch odrębnych przedsiębiorstwach i wyprowadzili niemalże identyczne równania.

Wartości zmętnienia i przepuszczalności również należy oceniać niezależnie, aby stwierdzić, czy badana substancja chemiczna wywoływała działanie żrące lub silnie drażniące wyłącznie w jednym z dwóch punktów końcowych (zob. kryteria podejmowania decyzji).

Kryteria podejmowania decyzji

Wartości graniczne oceny punktowej działania drażniącego *in vitro* (IVIS) służące do identyfikowania badanych substancji chemicznych jako powodujące poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ) oraz badanych substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ), podano poniżej:

IVIS	GHS ONZ
≤3	Brak kategorii
>3; ≤55	Nie można przewidzieć działania
>55	Kategoria 1

Kryteria dopuszczalności badania

Badanie uznaje się za dopuszczalne, jeżeli kontrola dodatnia daje wskaźnik IVIS mieszczący się w ramach dwóch odchyleń standardowych od obecnej historycznej średniej, którą należy aktualizować co najmniej co trzy miesiące lub za każdym razem, gdy dopuszczalne badanie przeprowadza się w laboratoriach, w których rzadko przeprowadza się badania (tj. rzadziej niż raz na miesiąc). Wartości zmętnienia i przepuszczalności otrzymane w wyniku reakcji otrzymanych w kontroli ujemnej lub kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem powinny

▼M7

być niższe do ustalonych górnych limitów wartości zmętnienia i przepuszczalności tła dla rogówek bydlęcych poddanych odpowiedniej kontroli ujemnej lub kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem. Pojedyncza seria badań, w skład której wchodzą co najmniej trzy rogówki, powinna wystarczyć dla badanej substancji chemicznej, jeśli otrzymana klasyfikacja jest jednoznaczna. W przypadku wyników granicznych otrzymanych podczas pierwszej serii badań należy jednak rozważyć przeprowadzenie drugiej serii badań (nie jest to konieczne) oraz trzeciej w przypadku niezgodnych średnich wyników IVIS między pierwszymi dwiema seriami badań. W związku z tym wynik pierwszej serii badań uznaje się za wynik graniczny, jeżeli prognozy dotyczące trzech rogówek były niezgodne, tj.:

— dwie z trzech rogówek dały niezgodne prognozy odbiegające od średniej dla wszystkich trzech rogówek ALBO

— jedna z trzech rogówek dała niezgodną prognozę odbiegającą od średniej dla wszystkich trzech rogówek ORAZ niezgodny wynik był większy o 10 jednostek IVIS od progu granicznego wynoszącego 55;

— jeżeli powtórzona seria badań potwierdzi prognozy serii badań wstępnych (na podstawie średniej wartości wskaźnika IVIS), wówczas można podjąć ostateczną decyzję bez dalszych badań. Jeżeli powtórzona seria badań będzie skutkowała prognozą niezgodną z serią badań wstępnych (na podstawie średniej wartości wskaźnika IVIS), wówczas należy przeprowadzić trzecią i ostatnią serię badań w celu przeanalizowania niejednoznacznych prognoz oraz zaklasyfikowania badanej substancji chemicznej. Dopuszczalne może być odstąpienie od dalszych badań na potrzeby klasyfikacji i oznakowania, w przypadku gdy każda seria badań prowadzi do prognozy dotyczącej zaliczenia do kategorii 1 wg GHS ONZ.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje, o ile są one istotne dla przebiegu badania:

Badane i kontrolne substancje chemiczne

— nazwa chemiczna (nazwy chemiczne), np. nazwa strukturalna używana przez Chemical Abstracts Service (CAS), po której następują inne nazwy, jeżeli są znane; numer CAS, jeżeli jest znany;

— czystość i skład badanej substancji chemicznej lub kontrolnej substancji chemicznej (jako wartość procentowa masy), w zakresie, w jakim te informacje są dostępne;

— właściwości fizykochemiczne istotne dla przebiegu badania, np. stan skupienia, lotność, pH, stabilność, klasa chemiczna, rozpuszczalność w wodzie;

— postępowanie z badanymi/kontrolnymi substancjami chemicznymi przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— stabilność, jeżeli jest znana.

Informacje dotyczące sponsora i placówki przeprowadzającej badanie

— nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań.

Warunki metody badawczej

— opis stosowanego przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki (np. model i specyfikacja) oraz ustawień urządzenia;

— informacje na temat wzorcowania urządzeń zastosowanych do pomiaru zmętnienia i przepuszczalności (np. przyrząd do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki i spektrofotometr) w celu zapewnienia liniowości pomiarów;

— rodzaj zastosowanego pojemnika na rogówkę (np. model i specyfikacja);

▼M7

— opis innych wykorzystanych urządzeń;

— procedura zastosowana w celu zapewnienia integralności (tj. dokładności i wiarygodności) metody badawczej w czasie (np. okresowe badanie substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości).

Kryteria dotyczące badania dopuszczalnego

— dopuszczalne zakresy jednoczesnej kontroli dodatniej i ujemnej na podstawie danych historycznych;

— w stosownych przypadkach dopuszczalny zakres jednoczesnej kontroli odniesienia na podstawie danych historycznych.

Pobieranie oczu i ich przygotowywanie

— identyfikacja źródła oczu (tj. zakład, z którego je pobrano);

— średnica rogówki jako miernik wieku zwierzęcia źródłowego i przydatności do analizy;

— warunki przechowywania i transportu oczu (np. data i czas pobrania oczu, odstęp czasu między pobraniem oczu a rozpoczęciem badania, środek transportu i temperatura, wszelkie podane antybiotyki);

— przygotowanie i umieszczenie rogówek bydła, w tym oświadczenia dotyczące ich jakości, temperatury pojemników na rogówkę oraz kryteria dotyczące wyboru rogówek do badania.

Procedura badawcza

— liczba użytych kontrprób;

— nazwa wykorzystanej kontroli ujemnej i dodatniej (w stosownych przypadkach, także kontrole z zastosowaniem rozpuszczalnika i kontrole odniesienia);

— stężenie badanej substancji chemicznej, zastosowanie, czas narażenia i czas inkubacji po narażeniu na działanie substancji;

— opis zastosowanych kryteriów oceny i podejmowania decyzji;

— opis zastosowanych kryteriów dopuszczalności badania;

— opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej;

— opis zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji.

Wyniki

— Tabelaryczne zestawienie danych dotyczących pojedynczych badanych próbek (np. wartości zmętnienia i OD490 oraz obliczony wskaźnik IVIS dla badanej substancji chemicznej oraz kontroli dodatniej, ujemnej i odniesienia [jeżeli została uwzględniona], przedstawione w postaci tabeli, w stosownych przypadkach z uwzględnieniem danych z powtórzeń doświadczenia z kontrpróbą oraz średnich ± odchylenie standardowe dla każdego doświadczenia);

— opis innych zaobserwowanych skutków;

— otrzymana klasyfikacja GHS ONZ *in vitro*, w stosownych przypadkach.

Omówienie wyników

Wniosek

▼**M7**

BIBLIOGRAFIA

(1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) oraz Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny (NTP) Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych (NICEATM). Publikacja NIH nr: 07-4517. Dostępne na stronie internetowej: 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. Publikacja NIH nr 10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Dostępne na stronie internetowej: 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. Seria OECD dotycząca badań i oceny nr 189, OECD, Paryż.

(4) ONZ (2011). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) ONZ, ST/SG/AC.10/30 Rev 4, Nowy Jork i Genewa: Organizacja Narodów Zjednoczonych: Dostępne na stronie internetowej: 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. i 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. W: ICCVAM Test Method Evaluation Report – *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) oraz Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny (NTP) Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych (NICEATM). Publikacja NIH nr: 07-4517. Dostępne na stronie internetowej: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. W: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) oraz Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny (NTP) Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych (NICEATM). Publikacja NIH nr: 10-7553A. Dostępne na stronie internetowej: 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, Włochy: Europejskie Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM).

(9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. i 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. i Komitet Doradczy ds. Praktyk w zakresie Kontroli Zakażeń w Opiece Zdrowotnej (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Dostępne na stronie internetowej: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

▼**M7**

(12) Maurer, J.K., Parker, R.D. i 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. Seria dotycząca badań i oceny nr 160. Przyjęto w dniu 25 października 2011 r. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. i Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159–2165.

(15) Collee, J. i 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. i 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) Rozdział B.5 niniejszego załącznika, Działanie żrące / silnie drażniące na oczy.

(18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. Publikacja NIH nr: 06-4512. Research Triangle Park: Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny. Dostępne na stronie internetowej: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

(19) OECD (1998). Seria dotycząca zasad dobrej praktyki laboratoryjnej i monitorowania zgodności. Nr 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Dostępne na stronie: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badawczej a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej.

Wzorcowa substancja chemiczna: substancja chemiczna używana jako wzorzec do porównań z badaną substancją chemiczną. Wzorcowa substancja chemiczna powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji chemicznych; (iii) znane właściwości fizyczne i chemiczne; (iv) dane potwierdzające występowanie znanych skutków oraz (v) znany potencjał w zakresie pożądanych reakcji.

Podejście oddolne: stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że nie wymaga zaklasyfikowania jako substancja powodująca podrażnienie lub poważne uszkodzenie oka; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych niewymagających zaklasyfikowania (wynik ujemny) od pozostałych substancji chemicznych (wynik dodatni).

Substancja chemiczna: substancja albo mieszanina.

Rogówka: przezroczysta warstwa w przedniej części gałki ocznej, która okrywa tęczówkę i źrenicę oraz wpuszcza światło do wnętrza oka.

Zmętnienie rogówki: pomiar stopnia zmętnienia rogówki wskutek narażenia na badaną substancję chemiczną. Zwiększone zmętnienie rogówki wskazuje na jej uszkodzenie. Zmętnienie można ocenić subiektywnie, jak w przypadku testu Draize'a wykonywanego na oku królika, lub obiektywnie przy użyciu odpowiedniego narzędzia np. „przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki".

Przepuszczalność rogówki: ilościowy pomiar szkody wyrządzonej w nabłonku rogówki poprzez określenie, jaka ilość barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny przenika przez wszystkie warstwy rogówki.

Podrażnienie oka: zmiany w oku spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na wierzchnią warstwę oka, które są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „odwracalne skutki działania na oczy" oraz ze sformułowaniem „kategoria 2 GHS ONZ" (4).

Odsetek wyników fałszywie ujemnych: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik ujemny. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

Odsetek wyników fałszywie dodatnich: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik dodatni. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub)populacji na taki czynnik.

Ocena punktowa działania drażniącego *in vitro* (IVIS): wyprowadzony empirycznie wzór stosowany w metodzie badawczej BCOP, zgodnie z którym średnie wartości zmętnienia i przepuszczalności dla każdej grupy badanej są łączone w jedną ocenę punktową działania drażniącego *in vitro* dla każdej grupy badanej. *IVIS* = średnia wartość zmętnienia + (15 x średnia wartość przepuszczalności).

Nieodwracalne skutki działania na oczy: zob. „Poważne uszkodzenie oczu".

▼M7

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji niewchodzących ze sobą w reakcję (4).

Kontrola ujemna: kontrpróba niepoddana działaniu badanej substancji chemicznej zawierająca wszystkie składniki układu badawczego. Próbka ta jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji chemicznej oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia, czy rozpuszczalnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Niesklasyfikowane: substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane jako substancje podrażniające oczy (kategoria 2 2A lub 2B wg GHS ONZ) ani substancje powodujące poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ). Określenie używane zamiennie ze sformułowaniem „brak kategorii GHS ONZ".

Przyrząd do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki: narzędzie stosowane do pomiaru stopnia „zmętnienia rogówki" poprzez ilościową ocenę przepuszczalności światła przez rogówkę. Typowe urządzenie posiada dwie komory, z których każda ma własne źródło światła i fotokomórkę. W jednej z komór znajduje się badana rogówka, natomiast druga jest używana do wzorcowania i zerowania urządzenia. Światło z lampy halogenowej jest kierowane na fotokomórkę przez komorę kontrolną (pustą komorę bez okien i płynu), a następnie porównywane ze światłem kierowanym na fotokomórkę przez komorę doświadczalną, w której znajduje się komora zawierająca rogówkę. Porównuje się różnicę w przepuszczalności światła między fotokomórkami i na wyświetlaczu cyfrowym przedstawiana jest wartość liczbowa zmętnienia.

Kontrola dodatnia: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, stopień reakcji dodatniej nie powinien być nadmierny.

Odwracalne skutki działania na oczy: zob. „Działanie drażniące na oczy".

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną.

Poważne uszkodzenie oczu: uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie jest w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „nieodwracalne skutki działania na oczy" oraz ze sformułowaniem „kategoria 1 wg GHS ONZ" (4).

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, w tym rozpuszczalnik lub nośnik, która jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku lub nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą ujemną próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik lub nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Substancja: pierwiastki chemiczne i ich związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu (4).

▼M7

Środek powierzchniowo czynny: zwany także surfaktantem, jest to substancja, np. detergent, która może zmniejszać napięcie powierzchniowe cieczy, umożliwiając tym samym jej pienienie lub przenikanie w ciała stałe; substancja ta jest także zwana środkiem zwilżającym.

Mieszanina zawierająca środek powierzchniowo czynny: w kontekście niniejszej metody badawczej jest to mieszania zawierająca jeden lub większą ilość środków powierzchniowo czynnych w stężeniu końcowym >5 %.

Podejście odgórne: stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że powoduje poważne uszkodzenie oczu; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (wynik dodatni) od pozostałych substancji chemicznych (wynik ujemny).

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Wielopoziomowa strategia badań: strategia badań sekwencyjnych, w ramach której wszystkie istniejące informacje na temat badanej substancji chemicznej są analizowane na każdym poziomie w określonym porządku z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia przed przejściem do następnego poziomu. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji chemicznej potencjał w zakresie wywołania podrażnienia, dodatkowe badania nie są wymagane. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji nie można przypisać badanej substancji chemicznej potencjału wywołania podrażnień, przeprowadza się procedurę badań sekwencyjnych na zwierzętach do momentu, w którym będzie można dokonać jednoznacznej klasyfikacji.

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (4).

Kategoria 1 wg GHS ONZ: zob. „Poważne uszkodzenie oczu”.

Kategoria 2 wg GHS ONZ: zob. „Działanie drażniące na oczy”.

Brak kategorii wg GHS ONZ: substancje chemiczne, które nie spełniają wymogów w zakresie zaklasyfikowania jako należące do kategorii 1 lub 2 (2A lub 2B) wg GHS ONZ. Określenie używane zamiennie ze sformułowaniem „niesklasyfikowane”.

Zweryfikowana metoda badawcza: metoda badawcza, w odniesieniu do której zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zweryfikowana metoda badawcza może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu.

Waga dowodów: proces analizowania mocnych i słabych stron różnych informacji podczas formułowania wniosku dotyczącego potencjalnego zagrożenia stwarzanego przez badaną substancję chemiczną oraz uzasadnienia takiego wniosku.

▼M7

Dodatek 2

ZDOLNOŚĆ PREDYKCYJNA METODY BADAWCZEJ BCOP

Tabela 1

Zdolność predykcyjna BCOP w zakresie identyfikowania substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu [kategoria 1 wg GHS ONZ / unijnego rozporządzenia CLP a brak kategorii 1 (kategoria 2 + brak kategorii)]; kategoria I Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych a brak kategorii I (kategoria II + kategoria III + kategoria IV)]

System klasyfikacyjny	Liczba	Dokładność		Czułość		Wyniki fałszywie ujemne		Swoistość		Wyniki fałszywie dodatnie	
		%	Liczba	%	Liczba	%	Liczba	%	Liczba	%	Liczba
GHS ONZ unijne rozporządzenie CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabela 2

Zdolność predykcyjna BCOP w zakresie identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje powodujące podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu („substancje niewykazujące działania drażniącego”) [brak kategorii wg GHS ONZ / unijnego rozporządzenia CLP a brak kategorii (kategoria 1 + kategoria 2)]; kategoria IV Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych a brak kategorii IV (kategoria I + kategoria II + kategoria III)]

System klasyfikacyjny	Liczba	Dokładność		Czułość		Wyniki fałszywie ujemne		Swoistość		Wyniki fałszywie dodatnie	
		%	Liczba	%	Liczba	%	Liczba	%	Liczba	%	Liczba
GHS ONZ unijne rozporządzenie CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Dodatek 3

SUBSTANCJE CHEMICZNE PRZEZNACZONE DO OCENY BIEGŁOŚCI W ODNIESIENIU DO METODY BADAWCZEJ BCOP

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania niniejszej metody badawczej laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo ustalając klasyfikację 13 substancji chemicznych wskazanych w tabeli 1 pod względem działania niebezpiecznego dla oczu. Wspomniane substancje chemiczne zostały dobrane w taki sposób, by reprezentowały zakres reakcji na działanie niebezpieczne dla oczu oparty na wynikach badania na oku królika *in vivo* (wytyczna TG 405) (17) oraz na systemie klasyfikacji GHS ONZ (tj. kategorie 1, 2A, 2B lub niesklasyfikowane) (4). Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz istnieniem wysokiej jakości danych uzyskanych dzięki zastosowaniu metody BCOP *in vitro*. Dane referencyjne można znaleźć w poprawionym dokumencie zbiorczym (3) oraz w dokumentach przeglądowych ICCVAM dla metody badawczej BCOP (2) (18).

Tabela 1

Substancje chemiczne zalecane do wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do metody badawczej BCOP

Substancja chemiczna	Numer CAS	Klasa chemiczna ([1])	Stan skupienia	Klasyfikacja *in vivo* ([2])	Klasyfikacja BCOP
Chlorek benzalkoniowy (5 %)	8001-54-5	Związek oniowy	Ciecz	Kategoria 1	Kategoria 1
Chloroheksydyna	55-56-1	Amina, amidyna	Substancja stała	Kategoria 1	Kategoria 1
Kwas dibenzoilo-L-winowy	2743-38-6	Kwas karboksylowy, ester	Substancja stała	Kategoria 1	Kategoria 1
Imidazol	288-32-4	Związek heterocykliczny	Substancja stała	Kategoria 1	Kategoria 1
Kwas trichlorooctowy (30 %)	76-03-9	Kwas karboksylowy	Ciecz	Kategoria 1	Kategoria 1
Chlorek 2,6-dichlorobenzoilu	4659-45-4	Halogenek acylu	Ciecz	Kategoria 2A	Nie można przewidzieć w sposób dokładny / wiarygodny
2-metyloacetylooctan etylu	609-14-3	Keton, ester	Ciecz	Kategoria 2B	Nie można przewidzieć w sposób dokładny / wiarygodny
Azotan amonu	6484-52-2	Sól nieorganiczna	Substancja stała	Kategoria 2 ([3])	Nie można przewidzieć w sposób dokładny / wiarygodny
EDTA, sól dipotasowa	25102-12-9	Amina, kwas karboksylowy (sól)	Substancja stała	Niesklasyfikowany	Niesklasyfikowany
Tween 20	9005-64-5	Ester, polieter	Ciecz	Niesklasyfikowany	Niesklasyfikowany
2-Mercaptopyrimidine	1450-85-7	Halogenek acylu	Substancja stała	Niesklasyfikowany	Niesklasyfikowany
Fenylobutazon	50-33-9	Związek heterocykliczny	Substancja stała	Niesklasyfikowany	Niesklasyfikowany

▼M7

Substancja chemiczna	Numer CAS	Klasa chemiczna (1)	Stan skupienia	Klasyfikacja *in vivo* (2)	Klasyfikacja BCOP
Polioksyetylenowany eter laurylu 23 (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkohol	Ciecz	Niesklasyfikowany	Niesklasyfikowany

Skróty: Nr CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service.

(1) Klasy chemiczne przypisano do każdej badanej substancji chemicznej, wykorzystując standardowy schemat klasyfikacji oparty o system klasyfikacji Medical Subject Headings (MeSH), opracowany przez National Library of Medicine (dostępny pod adresem http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Na podstawie wyników badania *in vivo* na oku królika (wytyczna OECD TG 405) (17) i z zastosowaniem GHS ONZ (4).

(3) Zaklasyfikowanie do kategorii 2A lub 2B zależy od interpretacji kryterium GHS ONZ dotyczącego rozróżnienia tych dwóch kategorii, tj. 1 spośród 3 zwierząt lub 2 spośród 3 zwierząt, u których w dniu 7. odnotowano skutki niezbędne do zakwalifikowania substancji chemicznej do kategorii 2A. W badaniu *in vivo* brały udział 3 zwierzęta. Wszystkie punkty końcowe poza zaczerwienieniem spojówki u jednego zwierzęcia zupełnie ustały do dnia 7. lub wcześniej. Jedno ze zwierząt, u którego skutki działania substancji nie ustały do dnia 7., miało zaczerwienienie spojówki na poziomie 1 (w dniu 7.), które ustało w pełni w dniu 10.

▼M7

Dodatek 4

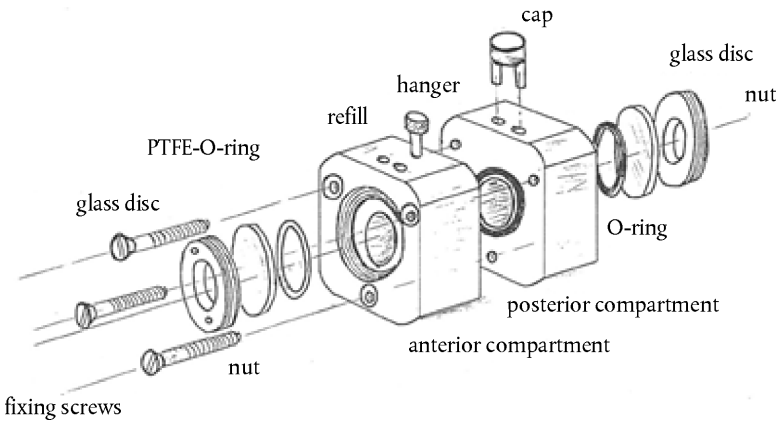
POJEMNIK NA ROGÓWKĘ W BADANIU BCOP

Pojemniki na rogówkę stosowane w badaniu BCOP wykonane są z obojętnego materiału (np. polipropylenu). Pojemniki składają się z dwóch połówek (komory przedniej i tylnej) i mają dwie podobne do siebie komory wewnętrzne o cylindrycznym kształcie. Każdą komorę skonstruowano tak, aby pomieściła 5 ml cieczy i kończyła się szklanym okienkiem, poprzez które można dokonać pomiaru zmętnienia. Każda z komór wewnętrznych ma 1,7 cm średnicy i 2,2 cm głębokości ([1]). Pierścień uszczelniający typu „O” umieszczony na komorze tylnej ma zapobiegać wyciekom. Rogówki umieszcza się stroną ze śródbłonkiem do dołu na pierścieniu tylnych komór, zaś komory przednie umieszcza się na stronie z nabłonkiem. Komory utrzymywane są w miejscu przez trzy śruby ze stali nierdzewnej umieszczone na zewnętrznych krawędziach komory. Na końcu każdej komory znajduje się szklane okienko, które można zdemontować w celu uzyskania łatwego dostępu do rogówki. Pomiędzy szklanym okienkiem a komorą umieszczony jest również pierścień uszczelniający typu „O” zapobiegający wyciekom. Dwa otwory na szczycie każdej komory umożliwiają wprowadzanie i usuwanie podłoża i badanych substancji. Otwory te są zamknięte gumowymi korkami w czasie podawania substancji chemicznej i w okresie inkubacji. Przepuszczalność światła przez pojemniki na rogówkę może potencjalnie ulec zmianie, ponieważ skutki zużycia lub nagromadzenia określonych pozostałości substancji chemicznej w otworach komory wewnętrznej oraz na szklanych okienkach może wpłynąć na rozpraszanie światła lub odbicie. W rezultacie może dojść do zwiększenia lub zmniejszenia podstawowej przepuszczalności światła (i odwrotnie, odczytów zmętnienia podstawowego) przez pojemniki na rogówkę oraz może być widoczne jako znaczące zmiany oczekiwanych podstawowych pomiarów początkowego zmętnienia rogówki w pojedynczych komorach (tj. wartości początkowego zmętnienia rogówki w określonych pojedynczych pojemnikach na rogówkę mogą rutynowo różnić się o ponad dwie lub trzy jednostki zmętnienia od oczekiwanych wartości podstawowych). Każde laboratorium powinno rozważyć ustanowienie programu oceny zmian w przepuszczalności światła przez pojemniki na rogówkę, w zależności od rodzaju badanych substancji chemicznych i częstotliwości wykorzystania komór. Aby ustanowić wartości podstawowe, pojemniki na rogówkę można sprawdzać przed rutynowym wykorzystaniem przez zmierzenie podstawowych wartości zmętnienia (lub przepuszczalności światła) komór wypełnionych w całości substancją biogenną, bez rogówek. Pojemniki na rogówkę są następnie okresowo kontrolowane pod kątem zmian w przepuszczalności światła w okresach użytkowania. Każde laboratorium może ustalić częstotliwość kontroli pojemników na rogówkę na podstawie badanych substancji chemicznych, częstotliwości stosowania i zaobserwowanych zmian w podstawowych wartościach zmętnienia rogówki. W przypadku zaobserwowania zmian w przepuszczalności światła przez pojemniki na rogówkę należy wziąć pod uwagę odpowiednie procedury czyszczenia lub polerowania wewnętrznej powierzchni pojemników na rogówkę lub ich wymianę.

([1]) Podane wymiary oparte są na wymiarach pojemników na rogówkę stosowanych w przypadku krów w wieku od 12 do 60 miesięcy. W przypadku zwierząt w wieku od 6 do 12 miesięcy pojemnik powinien być tak zaprojektowany, aby komora miała pojemność 4 ml, zaś każda z komór wewnętrznych miała średnicę 1,5 cm oraz głębokość 2,2 cm. W przypadku projektowania nowego pojemnika na rogówkę należy pamiętać, że stosunek wielkości eksponowanej powierzchni rogówki do pojemności komory tylnej powinien być taki sam jak w tradycyjnym pojemniku na rogówkę. Konieczne jest zapewnienie prawidłowego określenia wartości przepuszczalności na potrzeby obliczenia IVIS przez zastosowanie proponowanego wzoru.

▼M7

Pojemnik na rogówkę: widok zespołu rozebranego



▼M7

Dodatek 5

PRZYRZĄD DO POMIARU STOPNIA ZMĘTNIENIA ROGÓWKI

Przyrząd do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki jest to urządzenie służące do pomiaru przepuszczalności światła. Na przykład w przypadku sprzętu OP-KIT z Electro Design (Riom, Francja) wykorzystywanego podczas walidacji metody badawczej BCOP światło z lampy halogenowej jest kierowane na fotokomórkę przez komorę kontrolną (pustą komorę bez okien lub płynu), a następnie porównywane ze światłem kierowanym na fotokomórkę przez komorę doświadczalną, w której znajduje się komora zawierająca rogówkę. Porównuje się różnicę w przepuszczalności światła między fotokomórkami i na wyświetlaczu cyfrowym przedstawiana jest wartość liczbowa zmętnienia. Ustala się jednostki zmętnienia. Można wykorzystać inne rodzaje przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki o różnej konfiguracji (np. niewymagające równoległych pomiarów kontroli i komór doświadczalnych), jeżeli zostanie udowodnione, że dają podobne wyniki co zatwierdzony sprzęt.

Przyrząd do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki powinien dawać linearną odpowiedź złożoną z pojedynczych odczytów zmętnienia obejmujących punkty odcięcia stosowane w różnych klasyfikacjach opisanych w modelu prognozowania (tj. do punktu odcięcia wskazującego na działanie żrące/silnie drażniące). W celu zapewnienia dokładnych linearnych odczytów do 75–80 jednostek zmętnienia konieczne jest przeprowadzenie kalibracji przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki przy użyciu kilku kalibratorów. Kalibratory umieszcza się w komorze kalibracyjnej (komorze na rogówkę przeznaczonej do umieszczenia kalibratorów) i odczytuje na przyrządzie do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki. Komora kalibracyjna jest przeznaczona do umieszczenia kalibratorów w przybliżeniu w takiej samej odległości od źródła światła i fotokomórki, w jakiej zlokalizowane będą rogówki podczas pomiaru zmętnienia. Wartości odniesienia i wstępne ustawienia zależą od rodzaju stosowanego sprzętu. Liniowość pomiarów zmętnienia należy zapewnić poprzez odpowiednie procedury (typowe dla konkretnego przyrządu). Na przykład w odniesieniu do sprzętu OP-KIT z Electro Design (Riom, Francja) przyrząd do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki wzorcuje się najpierw na 0 jednostek zmętnienia przy użyciu komory wzorcującej bez kalibratora. Następnie w komorze kalibracyjnej umieszcza się pojedynczo trzy różne kalibratory i dokonuje pomiaru zmętnienia. Kalibratory 1, 2 i 3 powinny dawać odczyty zmętnienia równe ich ustalonym wartościom odpowiednio 75, 150 i 225 jednostek zmętnienia, ± 5 %.”;

▼M7

B.48. **METODA BADANIA NA IZOLOWANYM OKU KURZYM DO CELÓW IDENTYFIKACJI (I) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH POWODUJĄCYCH POWAŻNE USZKODZENIE OCZU ORAZ (II) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH, KTÓRE NIE WYMAGAJĄ ZAKLASYFIKOWANIA JAKO SUBSTANCJE DRAŻNIĄCE OCZY LUB POWODUJĄCE POWAŻNE USZKODZENIE OCZU**

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 438 (2013). Metoda badania na izolowanym oku kurzym (ICE) została oceniona przez Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) przy udziale Europejskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM) i Japońskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (JaCVAM) w latach 2006 i 2010 (1) (2) (3). W ramach pierwszej oceny ICE zatwierdzono jako potwierdzoną naukową metodę badawczą do stosowania jako badanie przesiewowe w celu identyfikacji substancji chemicznych (substancji i mieszanin) powodujących poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1) określonych przez Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ) (1) (2) (4) oraz rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (rozporządzenie CLP) ([1]). W ramach drugiej oceny metodę badawczą ICE oceniono pod kątem wykorzystania jako badanie przesiewowe do celów identyfikowania substancji chemicznych niesklasyfikowanych jako powodujące podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu, określonych przez GHS ONZ (3) (4). Wyniki badania walidacyjnego i zalecenia panelu naukowego ds. wzajemnej oceny utrzymały pierwotne zalecenie dotyczące stosowania ICE do celów klasyfikowania substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ), ponieważ dostępna baza danych pozostała niezmieniona od czasu pierwotnego zatwierdzenia przez ICCVAM. Na tym etapie nie zasugerowano żadnych dodatkowych zaleceń dotyczących rozszerzenia dziedziny zastosowania ICE w celu uwzględnienia również innych kategorii. Przeprowadzono ponowną ocenę zbioru danych dotyczących *in vitro* i *in vivo* wykorzystywanych w badaniu walidacyjnym ze szczególnym uwzględnieniem oceny przydatności ICE do identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu (5). W ramach tej ponownej oceny stwierdzono, że metodę badawczą ICE można wykorzystać również do identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie i poważne uszkodzenie oczu zgodnie z GHS ONZ (4) (5). Niniejsza metoda badawcza obejmuje zalecane stosowanie i ograniczenia metody badawczej ICE oparte na tych ocenach. Główne różnice między pierwotną wersją wytycznych OECD dotyczących badań z 2009 r. a zaktualizowaną wersją z 2013 r. odnoszą się m.in. do: wykorzystania metody badawczej ICE do identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania według systemu klasyfikacji GHS ONZ, aktualizacji elementów sprawozdania z badania, aktualizacji dodatku 1 zawierającego definicje oraz aktualizacji dodatku 2 zawierającego substancje chemiczne zalecane do oceny biegłości.

Obecnie powszechnie uznaje się, że w dającej się przewidzieć przyszłości żaden pojedynczy test działania drażniącego na oko *in vitro* nie będzie w stanie zastąpić testu działania drażniącego na oko *in vivo* wg Draize'a na potrzeby prognozowania pełnego zakresu działania drażniącego różnych klas chemicznych. Strategiczne połączenia kilku alternatywnych metod badawczych w ramach (zintegrowanej) strategii badań mogą jednak być w stanie zastąpić test działania drażniącego na oko wg Draize'a (6). Podejście odgórne (7) ma w założeniu być stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna będzie miała wysoki potencjał działania drażniącego, podejście oddolne (7) ma być natomiast stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna nie spowoduje podrażnienia oczu w stopniu wymagającym zaklasyfikowania jej jako substancji

([1]) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

▼M7

drażniącej dla oczu. Metoda badawcza ICE jest metodą badawczą *in vitro*, którą można stosować w niektórych okolicznościach i przy określonych ograniczeniach, jak opisano w pkt 8–10 do celów klasyfikacji i oznakowania substancji chemicznych pod względem zagrożeń dla oczu. Chociaż uważa się, że metoda badawcza ICE nie może samodzielnie zastąpić badania na oku królika *in vivo*, jest ona zalecana jako pierwszy etap w strategii badań takiej jak podejście odgórne zaproponowane przez Scotta *et al*. (7) na potrzeby identyfikacji substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu, tj. substancji chemicznych, które należy zaklasyfikować do kategorii 1 wg GHS ONZ bez dalszych badań (4). Metoda badawcza ICE jest również zalecana do celów identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu zgodnie z GHS ONZ (brak kategorii) (4), i można ją w związku z tym stosować jako pierwszy etap w strategii badań zakładającej podejście oddolne (7). Konieczne będzie jednak przeprowadzenie dodatkowego badania (*in vitro* lub *in vivo*) w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której nie przewidziano, że spowoduje poważne uszkodzenie oczu lub której nie zaklasyfikowano do substancji powodujących podrażnienie/poważne uszkodzenie oczu w ramach metody badawczej ICE, w celu ustanowienia ostatecznej klasyfikacji. Ponadto przed zastosowaniem metody badawczej ICE w ramach podejścia oddolnego należy skonsultować się z odpowiednimi organami regulacyjnymi zgodnie z systemami klasyfikacji innymi niż GHS ONZ.

Niniejsza metoda badawcza ma na celu opisanie procedur stosowanych do oceny potencjalnego działania szkodliwego dla oczu badanej substancji chemicznej, określanego na podstawie jej potencjału oddziaływania toksycznego na oko kurze poddane enukleacji. Toksyczne oddziaływanie na rogówkę mierzy się przy zastosowaniu (i) jakościowej oceny zmętnienia, (ii) jakościowej oceny uszkodzenia nabłonka poprzez zaaplikowanie fluoresceiny na oko (zatrzymanie fluoresceiny), (iii) ilościowego pomiaru zwiększonej grubości (obrzęku) oraz (iv) jakościowej oceny makroskopowych uszkodzeń morfologicznych powierzchni. Oceny zmętnienia rogówki, obrzęku i uszkodzeń po narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej dokonuje się indywidualnie, a następnie łączy się je w celu otrzymania klasyfikacji działania drażniącego dla oczu.

Definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

Niniejsza metoda badawcza opiera się na protokole zaproponowanym w wytycznych OECD 160 (8), który opracowano po przeprowadzeniu przez ICCVAM międzynarodowego badania walidacyjnego (1) (3) (9), przy udziale Europejskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych, Japońskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych oraz Departamentu Jakości Życia Działu Toksykologii i Farmakologii Stosowanej TNO (Niderlandy). Protokół opiera się na informacjach uzyskanych z opublikowanych protokołów oraz bieżących protokołów stosowanych przez TNO (10) (11) (12) (13) (14).

Zbadano szeroki zakres substancji chemicznych w ramach walidacji leżącej u podstaw niniejszej metody badawczej, a empiryczna baza danych z badania walidacyjnego objęła 152 substancje chemiczne, w tym 72 substancje i 80 mieszanin (5). Metoda badawcza ma zastosowanie do ciał stałych, cieczy, emulsji i żeli. Płyny mogą być wodne lub niewodne; substancje stałe mogą być rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie. Gazów i aerozoli nie oceniano jeszcze w badaniu walidacyjnym.

Metodę badawczą ICE można wykorzystać do identyfikacji substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu, tj. substancji chemicznych zaklasyfikowanych do kategorii 1 wg GHS ONZ (4). W przypadku wykorzystywania jej do tego celu zidentyfikowane ograniczenia metody badawczej ICE opierają się na wysokich odsetkach wyników fałszywie dodatnich w przypadku alkoholi i wysokim odsetku wyników fałszywie ujemnych w przypadku ciał stałych i środków powierzchniowo czynnych (1) (3) (9). W tym kontekście odsetek wyników fałszywie ujemnych (substancje chemiczne należące do kategorii 1 wg GHS ONZ, lecz niezidentyfikowane jako takie) nie ma decydującego znaczenia, ponieważ wszystkie badane substancje chemiczne, które okazały się ujemne zostaną następnie zbadane za pomocą innych odpowiednio zweryfikowanych badań *in vitro* lub jako ostatni wariant na królikach, w zależności od

▼M7

wymogów regulacyjnych, przy zastosowaniu strategii badań sekwencyjnych zgodnie z podejściem opartym na analizie wagi dowodów. Należy zauważyć, że substancje stałe mogą prowadzić do zmiennych i ekstremalnych warunków narażenia w teście działania drażniącego na oko *in vivo* wg Draize'a, co z kolei może skutkować nietrafnymi prognozami ich rzeczywistego potencjału działania drażniącego (15). Osoby przeprowadzające badanie mogą rozważyć zastosowanie niniejszej metody badawczej w odniesieniu do wszystkich rodzajów substancji chemicznych, wskutek czego wynik dodatni należy zaakceptować jako wskazujący na poważne uszkodzenie oczu, tj. zaklasyfikować go do kategorii 1 wg GHS ONZ bez dalszych badań. Wyniki dodatnie uzyskane w przypadku alkoholi należy jednak interpretować z ostrożnością ze względu na ryzyko ich zawyżenia.

W przypadku wykorzystania metody badawczej ICE do identyfikacji substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ) metoda ta wykazuje ogólną dokładność na poziomie 86 % (120/140), odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie 6 % (7/113) oraz odsetek wyników fałszywie ujemnych na poziomie 48 % (13/27) w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badań na oku królika *in vivo*, sklasyfikowanych zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ (4) (5).

Metodę badawczą ICE można wykorzystać również do identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu według systemu klasyfikacji GHS ONZ (4). Przed zastosowaniem metody badawczej ICE w ramach podejścia oddolnego należy skonsultować się z odpowiednimi organami regulacyjnymi zgodnie z innymi systemami klasyfikacji. Niniejszą metodę badawczą można zastosować w odniesieniu do wszystkich rodzajów substancji chemicznych, wskutek czego wynik ujemny należy zaakceptować, aby nie uznawać substancji chemicznej za powodującą podrażnienie i poważne uszkodzenie oczu. Bazowanie na jednym wyniku z bazy danych z badania walidacyjnego może jednak doprowadzić do zaniżenia prognoz dotyczących farb przeciwporostowych zawierających rozpuszczalnik organiczny (5).

W przypadku wykorzystania metody badawczej ICE do identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie i poważne uszkodzenie oczu metoda ta wykazuje ogólną dokładność na poziomie 82 % (125/152), odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie 33 % (26/79) oraz odsetek wyników fałszywie ujemnych na poziomie 1 % (1/73) w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badań na oku królika *in vivo*, sklasyfikowanych zgodnie z GHS ONZ (4) (5). W przypadku wykluczenia z bazy danych badanych substancji chemicznych należących do określonych klas (tj. farb przeciwporostowych zawierających rozpuszczalnik organiczny), dokładność metody badawczej ICE wynosi 83 % (123/149), odsetek wyników fałszywie dodatnich wynosi 33 % (26/78) a odsetek wyników fałszywie ujemnych 0 % (0/71) zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ (4) (5).

Nie zaleca się stosowania metody badawczej ICE do identyfikacji badanych substancji chemicznych, które należy uznać za powodujące podrażnienie oczu (tj. zaklasyfikować do kategorii 2 lub 2A wg GHS ONZ) lub badanych substancji chemicznych, które należy uznać za lekko drażniące dla oczu (kategoria 2B wg GHS ONZ), ze względu na zaniżoną klasyfikację znacznej liczby substancji chemicznych należących do kategorii 1 i uznanie ich za należące do kategorii 2, 2A lub 2B wg GHS ONZ oraz ze względu na zawyżoną klasyfikację i uznanie substancji chemicznych nieprzypisanych do żadnej kategorii wg GHS ONZ za substancje z kategorii 2, 2A lub 2B wg GHS ONZ. W tym celu konieczne może być przeprowadzenie dodatkowego badania, z wykorzystaniem innej odpowiedniej metody.

Wszystkie procedury przeprowadzane z wykorzystaniem oczu kurzych powinny przebiegać zgodnie z przepisami i procedurami dotyczącymi postępowania z materiałem pozyskanym od ludzi lub zwierząt, który obejmuje m.in. tkanki i płyny tkankowe, obowiązującymi w placówce przeprowadzającej badanie. Zaleca się przestrzeganie ogólnych środków ostrożności dla laboratoriów (16).

Chociaż w metodzie badawczej ICE nie uwzględnia się uszkodzeń spojówki i tęczówki ocenionych w ramach metody badawczej dotyczącej podrażnienia oczu królika, metoda ta odnosi się do oddziaływania na rogówkę, co stanowi główne kryterium klasyfikacji *in vivo*, w przypadku rozważania klasyfikacji GHS ONZ. Ponadto, chociaż w metodzie badawczej ICE nie można ocenić odwracalności zmian w rogówce jako takich, zaproponowano, na podstawie badań oczu królika, możliwość zastosowania oceny początkowego stadium uszkodzenia rogówki w celu określenia niektórych rodzajów nieodwracalnych skutków (17).

▼M7

W szczególności konieczna jest dodatkowa wiedza naukowa, aby zrozumieć sposób powstawania nieodwracalnych skutków niezwiązanych z pierwszym wystąpieniem poważnego uszkodzenia. Metoda badawcza ICE nie pozwala też na ocenę potencjalnej toksyczności ogólnoustrojowej związanej z narażeniem oczu.

Niniejsza metoda badawcza będzie aktualizowana okresowo w miarę uwzględniania nowych informacji i danych. Na przykład histopatologia może być potencjalnie przydatna, gdy potrzebna będzie bardziej szczegółowa charakterystyka uszkodzenia rogówki. Aby ocenić tę możliwość, użytkowników zachęca się do zachowywania oczu i przygotowywania wycinków histopatologicznych, które można wykorzystać do opracowania bazy danych i kryteriów podejmowania decyzji w celu dalszego poprawienia dokładności niniejszej metody badawczej. OECD opracowała wytyczne dotyczące stosowania metod badawczych *in vitro* toksyczności dla oczu, które zawierają szczegółowe procedury gromadzenia wycinków histopatologicznych i informacje na temat miejsca dostarczenia wycinków lub danych histopatologicznych (8).

W każdym laboratorium zaczynającym przeprowadzanie tego badania należy zastosować substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości wymienione w dodatku 2. Laboratorium może stosować te substancje chemiczne w celu wykazania swojej biegłości technicznej w zakresie przeprowadzania metody badawczej ICE przed przedstawieniem danych z badania ICE do celów regulacyjnej klasyfikacji zagrożeń.

ZASADA BADANIA

Metoda badawcza ICE jest modelem organotypowym, który zapewnia krótkotrwałe zachowanie oka kurzego *in vitro*. Uszkodzenia spowodowane badaną substancją chemiczną ocenia się w ramach niniejszej metody badawczej na podstawie obrzęku i zmętnienia rogówki oraz zatrzymania fluoresceiny. Podczas gdy dwa ostatnie parametry wymagają oceny jakościowej, analiza obrzęku rogówki stanowi ocenę ilościową. Każdy pomiar przelicza się na wynik ilościowy stosowany do obliczania ogólnego wskaźnika podrażnienia albo przypisuje się mu kategorię jakościową stosowaną do przypisania kategorii w klasyfikacji *in vitro* pod względem zagrożeń dla oczu – kategoria 1 wg GHS ONZ albo niesklasyfikowana wg GHS ONZ. Każdy z tych wyników można następnie zastosować do przewidzenia potencjalnego poważnego uszkodzenia oczu *in vivo* lub braku wymogu zaklasyfikowania badanej substancji chemicznej do substancji powodujących uszkodzenie oczu (zob. kryteria podejmowania decyzji). Nie opracowano jednak żadnego systemu klasyfikacji substancji chemicznych, w przypadku których nie przewidziano, że spowodują poważne uszkodzenie oczu lub których nie zaklasyfikowano w ramach metody badawczej ICE (zob. pkt 11).

Pochodzenie i wiek oczu kurzych

Dotychczas oczy do niniejszej analizy pobierano od kurcząt uzyskiwanych z rzeźni, w której poddawano je ubojowi na potrzeby spożycia przez ludzi, co eliminowało konieczność wykorzystywania zwierząt laboratoryjnych. Stosuje się wyłącznie oczy zwierząt zdrowych, które uznano za odpowiednie do wprowadzenia do łańcucha żywnościowego człowieka.

Chociaż nie przeprowadzono badania z grupą kontrolną w celu oceny optymalnego wieku kurcząt, wiek i masa kurcząt wykorzystywanych dotychczas w niniejszej metodzie badawczej odpowiadają młodym kurczętom tradycyjnie przetwarzanym przez rzeźnie drobiu (tzn. ok. 7 tygodni, 1,5–2,5 kg).

Pobieranie oczu i ich transport do laboratorium

Głowy należy usunąć natychmiast po sedacji kurcząt (najczęściej przy użyciu wstrząsu elektrycznego) i nacięciu szyi w celu wywołania krwawienia. Należy zapewnić lokalne źródło kurcząt, zlokalizowane blisko laboratorium, tak by głowy zwierząt mogły zostać przetransportowane z rzeźni do laboratorium na tyle szybko, żeby zminimalizować możliwość pogorszenia stanu oczu lub skażenia bakteriami. Należy zminimalizować odstęp czasu między pobraniem głów kurcząt a umieszczeniem oczu w komorze do przepłukiwania po enukleacji oczu (zwykle do dwóch godzin) w celu zapewnienia spełnienia kryteriów dopuszczalności analizy. Wszystkie oczy wykorzystane w badaniu powinny pochodzić z tej samej grupy oczu pobranych danego dnia.

▼M7

Ponieważ oczy wycina się w laboratorium, głowy w stanie nienaruszonym są transportowane z rzeźni w temperaturze otoczenia (zwykle w temp. od 18 °C do 25 °C), w plastikowych pojemnikach nawilżanych chusteczkami zmoczonymi w soli fizjologicznej.

Kryteria doboru oczu i liczba oczu zastosowanych w badaniu ICE

Odrzuca się oczy wykazujące po enukleacji wysoki poziom wybarwienia fluoresceiną (tzn. > 0,5) lub zmętnienia rogówki (tzn. > 0,5).

Każda grupa badana oraz grupa jednoczesnej kontroli dodatniej składa się z co najmniej tryech gałek ocznych. Grupa kontrolna ujemna lub grupa kontrolna z rozpuszczalnikiem (w przypadku stosowania rozpuszczalnika innego niż roztwór soli) składa się z co najmniej jednego oka.

W przypadku substancji stałych prowadzących do uzyskania wyniku w postaci braku kategorii wg GHS zaleca się przeprowadzenie drugiej serii badań na trzech gałkach ocznych w celu potwierdzenia lub odrzucenia wyniku ujemnego.

PROCEDURA

Przygotowanie oczu

Powieki wycina się ostrożnie, tak aby nie uszkodzić rogówki. Szybkiej oceny, czy rogówka jest nienaruszona, dokonuje się poprzez wkroplenie soli sodowej fluoresceiny o stężeniu 2 % (w/v) na powierzchnię rogówki na kilka sekund, a następnie przemycie rogówki solą fizjologiczną. Oczy poddane działaniu fluoresceiny bada się następnie przy użyciu biomikroskopu w celu zagwarantowania, że rogówka nie jest uszkodzona (tzn. że wyniki zatrzymania fluoresceiny oraz zmętnienia rogówki wynoszą ≤ 0,5).

Jeżeli oko nie jest uszkodzone, wycina się je całkowicie z czaszki, starając się nie uszkodzić rogówki. Gałkę oczną wyciąga się z oczodołu, przytrzymując mocno fałd półksiężycowaty spojówki szczypczykami chirurgicznymi, zaś mięśnie oka odcina się przy użyciu zagiętych tępo zakończonych nożyczek. Nie można dopuścić do powstania uszkodzeń rogówki poprzez wywieranie na nią nadmiernego nacisku (tj. stosowania urządzeń kompresyjnych).

Po wyjęciu gałki ocznej z oczodołu należy pozostawić przyczepioną widoczną część nerwu wzrokowego. Po wyjęciu z oczodołu oko umieszcza się na podkładce chłonnej i odcina się fałd półksiężycowaty spojówki i inne tkanki łączne.

Poddane enukleacji oko umieszcza się w uchwycie ze stali nierdzewnej, przy rogówce ustawionej pionowo. Uchwyt przenosi się następnie do komory urządzenia do przepłukiwania (18). Uchwyty należy umieścić w urządzeniu do przepłukiwania w taki sposób, by na całą rogówkę kapała sól fizjologiczna (3–4 krople na minutę lub 0,1–0,15 ml/min). Komory urządzenia do przepłukiwania powinny utrzymywać temperaturę 32 ± 1,5 °C. Dodatek 3 zawiera schemat budowy typowego urządzenia do przepłukiwania i uchwytów na oczy, które można nabyć na rynku lub zbudować samodzielnie. Urządzenie można zmodyfikować, tak by spełniało potrzeby konkretnego laboratorium (np. poprzez dostosowanie liczby oczu).

Po umieszczeniu w urządzeniu do przepłukiwania oczy bada się ponownie przy użyciu biomikroskopu w celu sprawdzenia, czy nie zostały one uszkodzone podczas procedury wycinania. W tym momencie należy również zmierzyć grubość rogówki na jej wierzchołku przy zastosowaniu urządzenia do pomiaru głębokości połączonego z biomikroskopem. Należy wymienić oczy (i) o wyniku zatrzymania fluoresceiny >0,5; (ii) o zmętnieniu rogówki > 0,5; lub (iii) posiadające jakiekolwiek ślady uszkodzenia. Oczy, których nie odrzucono ze względu na jedno z powyższych kryteriów, należy odrzucić, jeżeli grubość ich rogówki różni się o ponad 10 % od średniej wartości dla wszystkich oczu. Użytkownicy powinni być świadomi, że biomikroskopy mogą dawać różne wyniki pomiaru grubości rogówki, jeżeli stosuje się różne ustawienia szerokości szczeliny. Szerokość szczeliny powinna wynosić 0,095 mm.

▼M7

Po zbadaniu i dopuszczeniu wszystkich oczu inkubuje się je przez ok. 45 do 60 minut w celu zrównoważenia ich z układem badawczym przed dawkowaniem substancji. Po okresie wyrównania stężeń rejestruje się zerowy pomiar referencyjny grubości rogówki i jej zmętnienia, który służy jako punkt odniesienia (tj. czas = 0). Wynik pomiaru fluoresceiny określony w momencie wycinania stosuje się jako pomiar odniesienia dla tego punktu końcowego.

Podawanie badanej substancji chemicznej

Natychmiast po dokonaniu zerowych pomiarów referencyjnych oko (w pojemniku) wyjmuje się z urządzenia do przepłukiwania i ustawia w pozycji poziomej, a na rogówkę aplikuje się badaną substancję chemiczną.

Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym bada się zwykle w stanie nierozcieńczonym, można je jednak w razie potrzeby rozcieńczyć (np. w ramach schematu badania). Preferowanym rozpuszczalnikiem do rozcieńczania badanych substancji chemicznych jest sól fizjologiczna. Można stosować również alternatywne rozpuszczalniki w kontrolowanych warunkach badania, należy jednak udowodnić zasadność zastosowania rozpuszczalników innych niż sól fizjologiczna.

Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym aplikuje się na rogówkę w taki sposób, by cała powierzchnia rogówki była równomiernie pokryta badaną substancją chemiczną; standardowa ilość wynosi 0,03 ml.

Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy w miarę możliwości jak najdokładniej rozdrobnić za pomocą moździerza i tłuczka lub podobnego urządzenia rozdrabniającego. Proszek należy zaaplikować na rogówkę w taki sposób, by jej powierzchnia była równomiernie pokryta badaną substancją chemiczną; standardowa ilość wynosi 0,03 g.

Badaną substancję chemiczną (ciecz lub substancja stała) nakłada się na 10 sekund, a następnie zmywa z oka solą fizjologiczną (ok. 20 ml) w temperaturze otoczenia. Następnie oko (w pojemniku) umieszcza się ponownie w urządzeniu do przepłukiwania w pierwotnej pozycji pionowej. W razie potrzeby można ponownie przemyć oko po pozostawieniu substancji przez 10 sekund i w kolejnych punktach czasowych (np. po odkryciu pozostałości badanej substancji chemicznej na rogówce). Na ogół ilość soli fizjologicznej dodatkowo zastosowanej do przemycia oka nie jest krytyczna, jednak istotne jest obserwowanie przyczepności substancji chemicznej do rogówki.

Kontrolne substancje chemiczne

Każde doświadczenie powinno obejmować jednoczesną kontrolę ujemną lub kontrolę z rozpuszczalnikiem/nośnikiem i kontrolę dodatnią.

W przypadku badania cieczy o stężeniu 100 % lub substancji stałych w ramach metody badawczej ICE jako jednoczesną kontrolę ujemną stosuje się sól fizjologiczną w celu wykrycia niespecyficznych zmian w układzie badawczym i zapewnienia, aby warunki badania nie prowadziły nieprawidłowo do reakcji w postaci działania drażniącego.

W przypadku badania cieczy rozcieńczonych w metodzie badawczej uwzględnia się jednoczesną grupę kontrolną z rozpuszczalnikiem/nośnikiem w celu wykrycia niespecyficznych zmian w układzie badawczym i zapewnienia, aby warunki badania nie prowadziły nieprawidłowo do reakcji w postaci działania drażniącego. Jak stwierdzono w pkt. 31 można stosować jedynie rozpuszczalnik/nośnik, w odniesieniu do którego wykazano, że nie wpływa niekorzystnie na układ badawczy.

W każdym doświadczeniu uwzględnia się substancję o znanym działaniu drażniącym dla oczu jako jednoczesną kontrolę dodatnią w celu zweryfikowania, czy wywołana została właściwa reakcja. Ponieważ w niniejszej metodzie badawczej stosuje się badanie ICE w celu zidentyfikowania substancji żrących lub silnie drażniących, do kontroli dodatniej należy użyć substancji chemicznej odniesienia, która wywołuje silną reakcję w niniejszej metodzie badawczej. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji

▼M7

w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża. Należy wyprodukować wystarczające dane *in vitro* do kontroli dodatniej, aby można było obliczyć określony statystycznie dopuszczalny zakres kontroli dodatniej. Jeżeli dla konkretnej kontroli dodatniej nie istnieją odpowiednie dane historyczne z metody badawczej ICE, może zajść konieczność przeprowadzenia badań w celu dostarczenia tych informacji.

Przykładowymi substancjami służącymi do kontroli dodatniej dla badanych substancji chemicznych w stanie ciekłym są 10-procentowy roztwór kwasu octowego lub 5-procentowy roztwór chlorku bezalkoniowego, zaś przykładowymi substancjami służącymi do kontroli dodatniej dla badanych substancji chemicznych w stanie stałym są wodorotlenek sodu lub imidazol.

Wzorcowe substancje chemiczne są przydatne do oceny potencjalnego działania drażniącego na oczy nieznanych substancji chemicznych z określonej klasy chemicznej lub produktowej lub do oceny względnego potencjalnego działania drażniącego substancji drażniącej dla oczu w określonym zakresie reakcji w postaci działania drażniącego.

Pomiar punktów końcowych

Rogówki poddane działaniu substancji chemicznej ocenia się przed podaniem tej substancji, a następnie po 30, 75, 120, 180 i 240 minutach (± 5 minut) od płukania po podaniu substancji chemicznej. Te punkty czasowe zapewniają odpowiednią liczbę pomiarów w trakcie czterogodzinnego okresu od podania substancji chemicznej, pozostawiając jednocześnie odpowiednią ilość czasu pomiędzy pomiarami na dokonanie koniecznych obserwacji wszystkich oczu.

Oceniane punkty końcowe to zmętnienie rogówki, obrzęk, zatrzymanie fluoresceiny i zmiany morfologiczne (np. wżery lub rozluźnienie nabłonka). Wszystkie punkty końcowe, z wyjątkiem zatrzymania fluoresceiny (które określa się wyłącznie przed poddaniem materiału działaniu badanej substancji chemicznej oraz 30 minut po nim) ustalane są we wszystkich powyższych punktach czasowych.

Zaleca się wykonanie fotografii celem udokumentowania zmętnienia rogówki, zatrzymania fluoresceiny, zmian morfologicznych oraz histopatologii, jeśli jest przeprowadzana.

Zachęca się użytkowników, aby po ostatniej ocenie po czterech godzinach utrwalili oczy w odpowiednim środku utrwalającym (np. obojętnej buforowanej formalinie) na potrzeby ewentualnego badania histopatologicznego (szczegółowe informacje można znaleźć w pkt 14 i pozycji (8) bibliografii).

Obrzęk rogówki określa się na podstawie pomiaru grubości rogówki dokonywanego przy użyciu grubościomierza optycznego w biomikroskopie. Wartość tę wyraża się procentowo i oblicza na podstawie pomiarów grubości rogówki według poniższego wzoru:

$$\left(\frac{\textit{grubość rogówki wpunkcie czasowym } t - \textit{grubość rogówki wpkt czasowym} = 0}{\textit{grubość rogówki wpunkcie czasowym} = 0} \right) \times 100$$

Średnią wartość procentowa obrzęku rogówki we wszystkich oczach poddanych badaniu oblicza się w oparciu o wszystkie punkty czasowe obserwacji. W oparciu o najwyższy średni wynik obrzęku rogówki zaobserwowany w dowolnym punkcie czasowym podaje się ogólny wynik dla kategorii w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej (zob. pkt 51).

Zmętnienie rogówki oblicza się przy zastosowaniu powierzchni rogówki, która jest najbardziej zmętniała, jak przedstawiono na tabeli 1. Średnią wartość procentową zmętnienia rogówki we wszystkich oczach poddanych badaniu oblicza się w oparciu o wszystkie punkty czasowe obserwacji. W oparciu o najwyższy średni wynik obrzęku rogówki zaobserwowany w dowolnym punkcie czasowym podaje się ogólny wynik dla kategorii w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej (zob. pkt 51).

▼M7

Tabela 1

Wyniki oceny zmętnienia rogówki

Wynik oceny	Obserwacja
0	Brak zmętnienia
0,5	Nieznaczne zmętnienie
1	Obszary pojedyncze lub rozproszone; wyraźnie widoczne elementy tęczówki
2	Łatwo zauważalny obszar półprzezroczysty; nieco zamazane elementy tęczówki
3	Poważne zmętnienie rogówki; nie są widoczne żadne konkretne elementy tęczówki; bardzo trudno jest określić wielkość źrenicy zwierzęcia
4	Całkowite zmętnienie rogówki; niewidoczna tęczówka

Zatrzymanie fluoresceiny ocenia się w punkcie czasowym obserwacji po 30 minutach, jak przedstawiono w tabeli 2. Średni poziom zatrzymania fluoresceiny we wszystkich badanych oczach oblicza się wyłącznie w punkcie czasowym obserwacji po 30 minutach; wartość tę stosuje się do określenia ogólnego wyniku dla kategorii w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej (zob. pkt 51).

Tabela 2

Wyniki zatrzymania fluoresceiny

Wynik oceny	Obserwacja
0	Brak zatrzymania fluoresceiny
0,5	Nieznaczne wybarwienie pojedynczych komórek
1	Wybarwienie pojedynczych komórek rozproszone na całej powierzchni rogówki poddanej działaniu substancji
2	Ogniskowe lub łączące się zwarte wybarwienie pojedynczych komórek
3	Łączące się duże obszary rogówki zatrzymują fluoresceinę

Zmiany morfologiczne obejmują „wżery” komórek nabłonka, „rozluźnienie” nabłonka, „stwardnienie” powierzchni rogówki oraz „przyleganie” badanej substancji chemicznej do rogówki. Ustalenia te mogą się różnić miedzy sobą stopniem zaawansowania i mogą występować jednocześnie. Klasyfikacja tych ustaleń jest subiektywna i zależna od interpretacji osoby przeprowadzającej badanie.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena danych

Wyniki badania zmętnienia rogówki, obrzęku rogówki i zatrzymania fluoresceiny należy oceniać osobno, tak aby wygenerować klasę ICE dla każdego punktu końcowego. Klasy ICE w odniesieniu do każdego punktu końcowego są następnie łączone w celu uzyskania klasyfikacji działania drażniącego dla oczu dla każdej badanej substancji chemicznej.

Kryteria podejmowania decyzji

Po dokonaniu oceny każdego punktu końcowego można przypisać klasy ICE w oparciu o wcześniej ustalony zakres. Interpretacji wyników dotyczących obrzęku rogówki (tabela 3), zmętnienia (tabela 4) i zatrzymania fluoresceiny (tabela 5) z zastosowaniem czterech klas ICE dokonuje się na podstawie skali przedstawionej poniżej. Należy zauważyć, że wyniki dotyczące obrzęku rogówki

▼M7

przedstawione w tabeli 3 mają zastosowanie wyłącznie w przypadku gdy jej grubość mierzy się przy użyciu biomikroskopu (np. Haag-Streit BP900) z urządzeniem do pomiaru głębokości nr 1, przy ustawieniu szczeliny na szerokość $9\frac{1}{2}$, co odpowiada 0,095 mm. Użytkownicy powinni być świadomi, że biomikroskopy mogą dawać różne wyniki pomiaru grubości rogówki, jeżeli stosuje się różne ustawienia szerokości szczeliny.

Tabela 3

Kryteria klasyfikacji ICE w odniesieniu do obrzęku rogówki

Średni obrzęk rogówki (%) (*)	Klasa ICE
0–5	I
> 5–12	II
> 12–18 (> 75 min po podaniu substancji)	II
> 12–18 (≤ 75 min po podaniu substancji)	III
> 18–26	III
> 26–32 (> 75 min po podaniu substancji)	III
> 26–32 (≤ 75 min po podaniu substancji)	IV
> 32	IV

(*) Najwyższy średni wynik zaobserwowany w dowolnym punkcie czasowym

Tabela 4

Kryteria klasyfikacji ICE w odniesieniu do zmętnienia

Maksymalna średnia wartość zmętnienia (*)	Klasa ICE
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Maksymalny średni wynik zaobserwowany w dowolnym punkcie czasowym (na podstawie wyników zmętnienia, jak określono w tabeli 1).

Tabela 5

Kryteria klasyfikacji ICE w odniesieniu do średniego poziomu zatrzymania fluoresceiny

Średni wynik zatrzymania fluoresceiny 30 minut po podaniu substancji (*)	Klasa ICE
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Na podstawie wyników określonych w tabeli 2.

Klasyfikację *in vitro* badanej substancji chemicznej ocenia się poprzez odczyt klasyfikacji GHS odpowiadającej połączeniu kategorii otrzymanych w odniesieniu do obrzęku rogówki, zmętnienia rogówki i zatrzymania fluoresceiny, jak opisano w tabeli 6.

▼M7

Tabela 6

Ogólne klasyfikacje *in vitro*

Klasyfikacja GHS ONZ	Kombinacja 3 punktów końcowych
Brak kategorii	3 × I 2 × I, 1 × II
Nie można przewidzieć działania	Inne kombinacje
Kategoria 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Zmętnienie rogówki ≥ 3 po 30 min (w co najmniej 2 oczach) Zmętnienie rogówki = 4 w dowolnym punkcie czasowym (w co najmniej 2 oczach) Znaczne rozluźnienie nabłonka (w co najmniej 1 oku)

(*) Mniej prawdopodobne kombinacje.

Kryteria dopuszczalności badania

Badanie uznaje się za dopuszczalne, jeżeli jednoczesną kontrolę ujemną lub kontrolę z rozpuszczalnikiem/nośnikiem oraz jednoczesną kontrolę dodatnią zidentyfikowano odpowiednio jako niesklasyfikowane zgodnie z GHS i należące do kategorii 1 wg GHS.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje, o ile są one istotne dla przebiegu badania:

Badane i kontrolne substancje chemiczne

— nazwa chemiczna (nazwy chemiczne), np. nazwa strukturalna używana przez Chemical Abstracts Service (CAS), po której następują inne nazwy, jeżeli są znane;

— numer CAS, jeżeli jest znany;

— czystość i skład badanych substancji chemicznych lub kontrolnych substancji chemicznych (jako wartość procentowa masy), w zakresie, w jakim te informacje są dostępne;

— właściwości fizykochemiczne istotne dla przebiegu badania, np. stan skupienia, lotność, pH, stabilność, klasa chemiczna, rozpuszczalność w wodzie;

— postępowanie z badaną/kontrolną substancja chemiczną przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— stabilność, jeżeli jest znana;

Informacje dotyczące sponsora i placówki przeprowadzającej badanie

— nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań;

— identyfikacja źródła oczu (np. zakład, w którym je pobrano);

Warunki metody badawczej

— opis zastosowanego układu badawczego;

▼M7

— zastosowany biomikroskop (np. model) i zastosowane ustawienia biomikroskopu;

— odniesienie do historycznych wyników kontroli ujemnej i dodatniej oraz, w stosownych przypadkach, danych historycznych wykazujących dopuszczalny zakres jednoczesnej kontroli odniesienia;

— procedura zastosowana w celu zapewnienia integralności (tj. dokładności i wiarygodności) metody badawczej w czasie (np. okresowe badanie substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości)).

Pobieranie oczu i ich przygotowywanie

— wiek i masa zwierzęcia dawcy oraz, w miarę dostępności, inne szczegółowe dane na temat zwierząt, od których pobrano oczy (np. płeć, szczep);

— warunki przechowywania i transportu oczu (np. data i czas pobrania oczu, odstęp czasu między zebraniem głów kurcząt a umieszczeniem oczu poddanych enukleacji w komorze do przepłukiwania);

— przygotowanie i umieszczenie oczu, w tym oświadczenia dotyczące ich jakości, temperatury komór na oczy oraz kryteria dotyczące wyboru oczu wykorzystywanych do badania.

Procedura badawcza

— liczba użytych kontrprób;

— nazwa wykorzystanej kontroli ujemnej i dodatniej (w stosownych przypadkach, także kontrole z zastosowaniem rozpuszczalnika i kontrole odniesienia);

— dawka badanej substancji chemicznej, zastosowanie i czas narażenia;

— punkty czasowe obserwacji (przed i po podaniu substancji chemicznej);

— opis zastosowanych kryteriów oceny i podejmowania decyzji;

— opis zastosowanych kryteriów dopuszczalności badania;

— opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej.

Wyniki

— zestawienie tabelaryczne wyników dotyczących obrzęku i zmętnienia rogówki oraz zatrzymania fluoresceiny otrzymanych dla każdego oka, w każdym punkcie czasowym obserwacji, w tym średnie wyniki podczas każdej obserwacji wszystkich badanych oczu;

— najwyższe zaobserwowane średnie wyniki dotyczące obrzęku i zmętnienia rogówki oraz zatrzymania fluoresceiny (od dowolnego punktu czasowego), a także ich powiązana klasa ICE.

— opis wszelkich, innych zaobserwowanych skutków;

— otrzymana klasyfikacja GHS ONZ *in vitro*;

— w razie potrzeby fotografie oka;

Omówienie wyników

Wniosek

▼**M7**

BIBLIOGRAFIA

(1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report – *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) oraz Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny (NTP) Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych (NICEATM). Publikacja NIH nr: 07-4517. Dostępne na stronie internetowej: 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. Dostępne na stronie internetowej: 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. Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) oraz Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny (NTP) Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych (NICEATM). Publikacja NIH nr: 10-7553A. Dostępne na stronie internetowej: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(4) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2011). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie czwarte zmienione, ONZ, Nowy Jork i Genewa, 2011. Dostępne na stronie internetowej: 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. Seria OECD dotycząca badań i oceny nr 188 (części 1 i 2), OECD, Paryż.

(6) Rozdział B.5 niniejszego załącznika, Działanie żrące / silnie drażniące na oczy.

(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) Wytyczne OECD (2011): „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". Seria OECD dotycząca badań i oceny nr 160, OECD, Paryż.

(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. Publikacja NIH nr: 06-4513. Research Triangle Park: Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny. Dostępne na stronie internetowej: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

(10) Prinsen, M.K. i 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, 13 s. Dostępne na stronie internetowej: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. i 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. i 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. i Komitet Doradczy ds. Praktyk w zakresie Kontroli Zakażeń w Opiece Zdrowotnej (2007).Guideline for Isolation Precautions:Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Dostępne na stronie internetowej: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

(17) Maurer, J.K., Parker, R.D. i 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 i R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471–480.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badawczej a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej.

Wzorcowa substancja chemiczna: substancja chemiczna używana jako wzorzec do porównań z badaną substancją chemiczną. Wzorcowa substancja chemiczna powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji chemicznych; (iii) znane właściwości fizyczne i chemiczne; (iv) dane potwierdzające znane skutki; oraz (v) znaną siłę działania w zakresie pożądanych reakcji.

Podejście oddolne: stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że nie wymaga zaklasyfikowania jako substancja powodująca podrażnienie lub poważne uszkodzenie oka; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych niewymagających zaklasyfikowania (wynik ujemny) od pozostałych substancji chemicznych (wynik dodatni).

Substancja chemiczna: substancja albo mieszanina.

Rogówka: przezroczysta warstwa w przedniej części gałki ocznej, która okrywa tęczówkę i źrenicę oraz wpuszcza światło do wnętrza oka.

Zmętnienie rogówki: pomiar stopnia zmętnienia rogówki wskutek narażenia na badaną substancję chemiczną. Zwiększone zmętnienie rogówki wskazuje na jej uszkodzenie.

Obrzęk rogówki: obiektywny pomiar stopnia rozdęcia rogówki w następstwie narażenia na badaną substancję chemiczną w badaniu ICE. Obrzęk rogówki wyraża się procentowo i oblicza się go na podstawie wyjściowych pomiarów grubości rogówki (sprzed podania dawki) i grubości mierzonej w równych odstępach czasu po narażeniu na badaną substancję chemiczną w badaniu ICE. Stopień obrzęku rogówki wskazuje na jej uszkodzenie.

Podrażnienie oka: zmiany w oku spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na wierzchnią warstwę oka, które są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „odwracalne skutki działania na oczy" oraz ze sformułowaniem „kategoria 2 GHS ONZ" (4).

Odsetek wyników fałszywie ujemnych: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik ujemny. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

Odsetek wyników fałszywie dodatnich: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik dodatni. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

Zatrzymanie fluoresceiny: subiektywny pomiar ilości fluoresceiny zatrzymanej w komórkach nabłonka rogówki w następstwie narażenia na substancję badaną w badaniu ICE. Stopień zatrzymania fluoresceiny wskazuje na uszkodzenie nabłonka rogówki.

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub)populacji na taki czynnik.

Nieodwracalne skutki działania na oczy: zob. „poważne uszkodzenie oczu" i „kategoria 1 wg GHS ONZ".

▼M7

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji niewchodzących ze sobą w reakcję (4).

Kontrola ujemna: kontrpróba niepoddana działaniu badanej substancji chemicznej zawierająca wszystkie składniki układu badawczego. Próbka ta jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji chemicznej oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia, czy rozpuszczalnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Niesklasyfikowane: substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane jako substancje podrażniające oczy (kategoria 2 wg GHS ONZ) ani substancje powodujące poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ). Określenie używane zamiennie ze sformułowaniem „brak kategorii wg GHS ONZ".

Kontrola dodatnia: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża.

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną.

Odwracalne skutki działania na oczy: zob. „podrażnienie oka" i „kategoria 2 wg GHS ONZ".

Poważne uszkodzenie oczu: uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „nieodwracalne skutki działania na oczy" oraz ze sformułowaniem„kategoria 1 wg GHS ONZ" (4).

Biomikroskop: narzędzie używane do bezpośredniego badania oka w powiększeniu pod mikroskopem dwuokularowym poprzez uzyskanie prostego obrazu stereoskopowego. W metodzie badawczej ICE narzędzie to stosuje się do oglądania przednich struktur oka kurzego, jak również do obiektywnego pomiaru grubości rogówki za pomocą urządzenia do pomiaru grubości połączonego z mikroskopem.

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, w tym rozpuszczalnik lub nośnik, która jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku lub nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą ujemną próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik lub nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Substancja: pierwiastki chemiczne i ich związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu (4).

Środek powierzchniowo czynny: zwany także surfaktantem, jest to substancja, np. detergent, która może zmniejszać napięcie powierzchniowe cieczy, umożliwiając tym samym jej pienienie lub przenikanie w ciała stałe; substancja ta jest także zwana środkiem zwilżającym.

▼M7

Podejście odgórne: stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że powoduje poważne uszkodzenie oczu; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (wynik dodatni) od pozostałych substancji chemicznych (wynik ujemny).

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Wielopoziomowa strategia badań: strategia badań sekwencyjnych, w ramach której wszystkie istniejące informacje na temat badanej substancji chemicznej są analizowane na każdym poziomie w określonym porządku z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia, przed przejściem do następnego poziomu. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji chemicznej potencjał w zakresie wywołania podrażnienia, dodatkowe badania nie są wymagane. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji nie można przypisać badanej substancji chemicznej potencjału w zakresie wywołania podrażnień, przeprowadza się procedurę badań sekwencyjnych na zwierzętach do momentu, w którym będzie można dokonać jednoznacznej klasyfikacji.

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (4).

Kategoria 1 wg GHS ONZ: zob. „poważne uszkodzenie oczu” lub „nieodwracalne skutki działania na oczy”.

Kategoria 2 wg GHS ONZ: zob. „podrażnienie oka” lub „odwracalne skutki działania na oczy”.

Brak kategorii GHS ONZ: substancje, które nie spełniają wymogów w zakresie zaklasyfikowania jako należące do kategorii 1 lub 2 (2A lub 2B) wg GHS ONZ. Określenie używane zamiennie ze sformułowaniem „niesklasyfikowane”.

Zweryfikowana metoda badawcza: metoda badawcza, w odniesieniu do której zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zweryfikowana metoda badawcza może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu.

Waga dowodów: proces analizowania mocnych i słabych stron różnych informacji podczas formułowania wniosku dotyczącego potencjalnego zagrożenia stwarzanego przez daną substancję chemiczną oraz uzasadnienia takiego wniosku.

▼M7

Dodatek 2

SUBSTANCJE CHEMICZNE PRZEZNACZONE DO OCENY BIEGŁOŚCI W ODNIESIENIU DO METODY BADAWCZEJ ICE

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania metody badawczej zgodnej z niniejszą metodą badawczą laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo ustalając klasyfikację 13 substancji chemicznych wskazanych w tabeli 1 pod względem działania niebezpiecznego dla oczu. Wspomniane substancje chemiczne zostały dobrane w taki sposób, by reprezentowały zakres reakcji na działanie niebezpieczne dla oczu oparty na wynikach badania na oku królika *in vivo* (wytyczna TG 405) oraz na systemie klasyfikacji GHS ONZ (tj. kategorie 1, 2A, 2B lub brak kategorii zgodnie z GHS ONZ) (4) (6). Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz istnieniem wysokiej jakości danych uzyskanych dzięki zastosowaniu metody ICE *in vitro*. Dane referencyjne można znaleźć w SSD (5) oraz w dokumentach przeglądowych ICCVAM dla metody badawczej ICE (9).

Tabela 1

Substancje chemiczne zalecane do wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do metody badawczej ICE

Substancja chemiczna	Numer CAS	Klasa chemiczna (1)	Stan skupienia	Klasyfikacja *in vivo* (2)	Klasyfikacja *in vitro* (3)
Chlorek benzalkoniowy (5 %)	8001-54-5	Związek oniowy	Ciecz	Kategoria 1	Kategoria 1
Chloroheksydyna	55-56-1	Amina, amidyna	Substancja stała	Kategoria 1	Kategoria 1
Kwas dibenzoilo-L-winowy	2743-38-6	Kwas karboksylowy, ester	Substancja stała	Kategoria 1	Kategoria 1
Imidazol	288-32-4	Związek heterocykliczny	Substancja stała	Kategoria 1	Kategoria 1
Kwas trichlorooctowy (30 %)	76-03-9	Kwas karboksylowy	Ciecz	Kategoria 1	Kategoria 1
Chlorek 2,6-dichlorobenzoilu	4659-45-4	Halogenek acylu	Ciecz	Kategoria 2A	Nie można dokonać żadnych prognoz (4)
Azotan amonu	6484-52-2	Sól nieorganiczna	Substancja stała	Kategoria 2A (5)	Nie można dokonać żadnych prognoz (4)
2-metyloacetylooctan etylu	609-14-3	Keton, ester	Ciecz	Kategoria 2B	Nie można dokonać żadnych prognoz (4)
Sulfotlenek dimetylu	67-68-5	Organiczny związek siarki	Ciecz	Brak kategorii	Brak kategorii
Glicerol	56-81-5	Alkohol	Ciecz	Brak kategorii	Brak kategorii (wynik graniczny)
Metylocyklopentan	96-37-7	Węglowodór (cykliczny)	Ciecz	Brak kategorii	Brak kategorii
n-heksan	110-54-3	Węglowodór (acykliczny)	Ciecz	Brak kategorii	Brak kategorii

▼M7

Substancja chemiczna	Numer CAS	Klasa chemiczna (1)	Stan skupienia	Klasyfikacja *in vivo* (2)	Klasyfikacja *in vitro* (3)
Trójoctan glicerolu	102-76-1	Lipid	Ciecz	Niesklasyfikowany	Brak kategorii

Skróty: Nr CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service.

(1) Klasy chemiczne przypisano do każdej badanej substancji chemicznej, wykorzystując standardowy schemat klasyfikacji oparty o system klasyfikacji Medical Subject Headings (MeSH), opracowany przez National Library of Medicine (dostępny pod adresem http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Na podstawie wyników badania na oku królika *in vivo* (wytyczna OECD TG 405) i z zastosowaniem GHS ONZ (4)(6).

(3) Na podstawie wyników badania ICE opisanych w tabeli 6.

(4) Połączenie wyników badania ICE innych niż wyniki opisane w tabeli 6 w celu identyfikacji braku kategorii wg GHS i kategorii 1 wg GHS (zob. tabela 6).

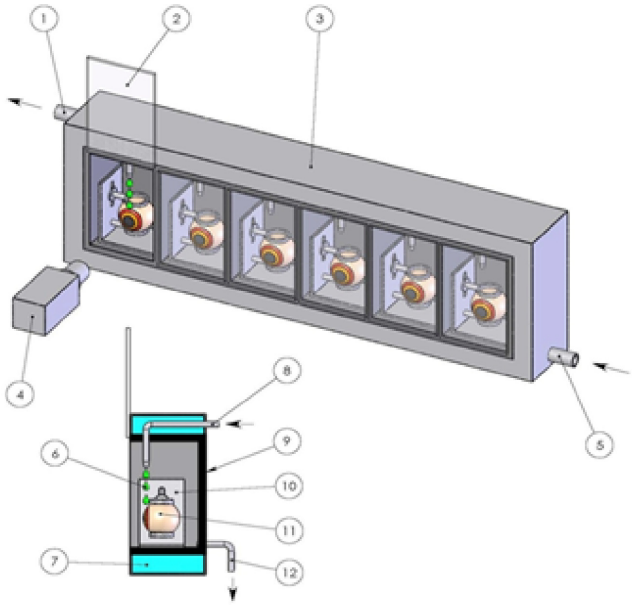
(5) Zaklasyfikowanie do kategorii 2A lub 2B zależy od interpretacji kryterium GHS ONZ dotyczącego rozróżnienia tych dwóch kategorii, tj. 1 spośród 3 zwierząt lub 2 spośród 3 zwierząt, u których w dniu 7. odnotowano skutki niezbędne do zakwalifikowania substancji chemicznej do kategorii 2A. W badaniu *in vivo* brały udział 3 zwierzęta. Wszystkie punkty końcowe poza zaczerwienieniem spojówki u jednego zwierzęcia zupełnie ustały do dnia 7. lub wcześniej. Jedno ze zwierząt, u którego skutki działania substancji nie ustały do dnia 7., miało zaczerwienienie spojówki na poziomie 1 (w dniu 7.), które ustało w pełni w dniu 10.

▼M7

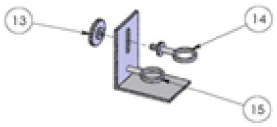
Dodatek 3

SCHEMATY BUDOWY URZĄDZENIA DO PRZEPŁUKIWANIA I UCHWYTÓW NA OCZY STOSOWANYCH W BADANIU ICE

(dodatkowe, ogólne opisy urządzenia do przepłukiwania i uchwytu na oko – zob. Burton et al. (18))



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Pozycja nr	Opis	Pozycja nr	Opis
1	Wylot ciepłej wody	9	Komora
2	Przesuwane drzwiczki	10	Uchwyt na oko
3	Urządzenie do przepłukiwania	11	Oko kurczaka
4	Miernik optyczny	12	Wylot roztworu soli
5	Wlot ciepłej wody	13	Śruba dociskowa
6	Roztwór soli	14	Regulowane ramię górne
7	Ciepła woda	15	Nieregulowane ramię dolne
8	Wlot roztworu soli		

▼M7

B.49. **TEST MIKROJĄDROWY NA KOMÓRKACH SSAKÓW *IN VITRO***

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 487 (2016). Stanowi ona część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. Opracowany został dokument OECD, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd ostatnich zmian, jakie wprowadzono do wytycznych dotyczących badań (1).

Test mikrojądrowy *in vitro* (MNvit) jest badaniem genotoksyczności służącym wykrywaniu mikrojąder (MN) w cytoplazmie komórek w interfazie. Mikrojądra mogą pochodzić odpowiednio z acentrycznych fragmentów chromosomów (tj. niezawierających centromeru) lub z całych chromosomów, które nie są w stanie migrować do biegunów w stadium anafazy podziału komórek. Test MNvit jest zatem metodą *in vitro*, która dostarcza kompleksowych podstaw do badania *in vitro* potencjalnego działania powodującego uszkodzenia chromosomowe, ponieważ w komórkach, w których doszło do podziału komórek podczas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej lub po nim, można wykryć zarówno aneugeny, jak i klastogeny (2) (3) (więcej szczegółów podano w pkt 13). Mikrojądra stanowią uszkodzenie, które zostało przekazane do komórek potomnych, podczas gdy aberracje chromosomowe znalezione w komórkach w metafazie nie mogą być przekazywane. W obu przypadkach zmiany mogą nie pokrywać się z przeżywaniem komórek.

Niniejsza metoda badawcza dopuszcza stosowanie protokołów z inhibitorem polimeryzacji aktyny cytochalazyną B i bez niego. Dodatek cytochalazyny B przed mitozą skutkuje powstawaniem komórek dwujądrowych i tym samym umożliwia identyfikację i analizę mikrojąder tylko w tych komórkach, które przeszły jedną mitozę (4) (5). Niniejsza metoda badawcza pozwala również na stosowanie protokołów bez zahamowania cytokinezy, pod warunkiem że istnieją dowody na to, że badana populacja komórek przeszła mitozę.

Oprócz testu MNvit wykorzystywanego do identyfikowania substancji chemicznych, które powodują powstawanie mikrojąder, dodatkowych informacji na temat mechanizmów uszkadzania chromosomów i powstawania mikrojąder może dostarczyć również wykorzystanie immunochemicznego oznakowania kinetochorów lub hybrydyzacji z sondami centromerowymi/telomerowymi (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Wspomniane procedury oznaczania i hybrydyzacji mogą być wykorzystywane w przypadku, gdy następuje intensyfikacja procesu powstawania mikrojąder i osoba przeprowadzająca badanie zamierza ustalić, czy intensyfikacja ta jest skutkiem jest skutkiem zdarzeń klastogennych lub aneugennych.

Ponieważ mikrojądra w komórkach w interfazie można ocenić stosunkowo obiektywnie, pracownicy laboratorium muszą jedynie ustalić liczbę komórek dwujądrowych w przypadku użycia cytochalazyny B oraz częstość występowania komórek mikrojądrowych we wszystkich przypadkach. W rezultacie można stosunkowo szybko ocenić szkiełka mikroskopowe i zautomatyzować analizę. Dzięki temu można ocenić nie setki, a tysiące komórek na jedno podanie substancji chemicznej, co zwiększa wydajność testu. Wreszcie, ponieważ mikrojądra mogą tworzyć się z chromosomów opóźnionych, istnieje możliwość wykrycia czynników wywołujących aneuploidię, które trudno badać w konwencjonalnych testach aberracji chromosomowych, np. rozdział B.10 niniejszego załącznika (18). Test MNvit opisany w niniejszej metodzie badawczej nie pozwala jednak na odróżnienie substancji chemicznych wywołujących zmiany w liczbie chromosomów lub ploidalności od substancji wywołujących klastogenność bez zastosowania specjalnych technik, takich jak badanie FISH, o którym mowa w pkt 4.

Test MNvit jest rzetelny i można go przeprowadzić na różnych rodzajach komórek oraz w obecności lub przy braku cytochalazyny B. Istnieją obszerne dane, które potwierdzają wiarygodność testu MNvit z wykorzystaniem różnych rodzajów komórek (kultury linii komórkowych lub pierwotnych hodowli komórek) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Obejmują one w szczególności międzynarodowe badania walidacyjne koordynowane przez Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) i sprawozdania z International Workshop on Genotoxicity

▼M7

Testing (międzynarodowych warsztatów poświęconych badaniu genotoksyczności) (5) (17). Dostępne dane zostały również poddane ponownej ocenie w retrospektywnym badaniu walidacyjnym opartym na analizie wagi dowodów, przeprowadzonym przez Europejskie Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM) Komisji Europejskiej (KE), zaś niniejsza metoda badawcza została zatwierdzona jako potwierdzona naukowo przez Naukowy Komitet Doradczy ECVAM (ESAC) (37) (38) (39).

W teście MNvit na komórkach ssaków można wykorzystać kultury linii komórkowych lub pierwotne hodowle komórek pochodzących od człowieka lub od gryzoni. Ponieważ podstawowa częstość występowania mikrojąder będzie miała wpływ na czułość badania, zaleca się wykorzystywanie rodzajów komórek o stałej i określonej częstości powstawania mikrojąder. Wykorzystywane komórki dobiera się na podstawie ich zdolności do wzrostu w kulturach, stabilności kariotypu (w tym liczby chromosomów) oraz spontanicznych częstości występowania mikrojąder (40). W chwili obecnej dostępne dane nie pozwalają na opracowanie konkretnych zaleceń, ale wynika z nich, że istotne jest, aby podczas oceny zagrożeń stwarzanych przez substancje chemiczne wziąć pod uwagę status białka p53, stabilność genetyczną (kariotypową), zdolność do naprawy DNA oraz pochodzenie (od gryzoni lub od człowieka) komórek wybranych do badania. Zachęca się zatem użytkowników niniejszej metody badawczej do uwzględniania wpływu tych oraz innych właściwości komórek na zachowanie linii komórkowej przy wykrywaniu indukcji mikrojąder w miarę rozwoju wiedzy w tej dziedzinie.

Stosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

Badania przeprowadzane *in vitro* wymagają zazwyczaj wykorzystania egzogennego źródła aktywacji metabolicznej, chyba że komórki są metabolicznie wydolne w odniesieniu do badanych substancji chemicznych. Egzogenny układ metabolizujący nie jest w stanie całkowicie naśladować warunków *in vivo*. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć wystąpienia warunków, które mogą doprowadzić do zniekształconych wyników dodatnich, które nie odzwierciedlają genotoksyczności badanych substancji chemicznych. Do takich warunków zalicza się zmiany pH (41) (42) (43) lub osmolalność, interakcje z podłożem do hodowli komórkowych (44) (45) bądź zbyt wysokie poziomy cytotoksyczności (zob. pkt 29).

Dla celów analizy indukcji mikrojąder istotne jest, aby mitoza zachodziła zarówno w kulturach poddanych działaniu badanej substancji, jak i w kulturach niepoddanych takiemu działaniu. Najpełniejsze informacje w zakresie zliczania mikrojąder można uzyskać na podstawie komórek, które przeszły jedną mitozę w trakcie poddawania ich działaniu badanej substancji chemicznej lub po nim. W przypadku wytworzonych nanomateriałów konieczne jest specjalne dostosowanie niniejszej metody badawczej, nie zostało to jednak opisane w niniejszej metodzie badawczej.

Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się nad tym, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

ZASADA BADANIA

Kultury komórkowe pochodzące od ludzi lub od innych ssaków poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej zarówno z zastosowaniem egzogennego źródła aktywacji metabolicznej, jak i bez takiego źródła, pod warunkiem że nie wykorzystuje się komórek o odpowiednich zdolnościach metabolicznych (zob. pkt 19).

Komórki są hodowane w trakcie narażenia na działanie badanej substancji chemicznej lub po zakończeniu takiego narażenia przez okres wystarczający do uszkodzenia chromosomów lub wystąpienia innego wpływu na cykl komórkowy lub podział komórek, tak aby doprowadzić do powstawania mikrojąder w komórkach w interfazie. Do celów indukcji aneuploidii badana substancja chemiczna powinna być co do zasady obecna w trakcie mitozy. Zebrane i zabarwione komórki w interfazie są analizowane pod kątem obecności mikrojąder. W warunkach idealnych mikrojądra powinny być zliczane tylko w tych komórkach, które przeszły mitozę podczas narażenia na badaną substancję chemiczną lub w okresie

▼M7

po poddaniu ich działaniu tej substancji, jeżeli taki okres jest stosowany. W kulturach, którym podano inhibitor cytokinezy, można to łatwo osiągnąć poprzez liczenie jedynie komórek dwujądrowych. W przypadku braku inhibitora cytokinezy ważne jest, aby wykazać, że w poddanych analizie komórkach prawdopodobnie doszło do podziału komórek, co wynika ze zwiększenia liczebności populacji komórek, podczas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej lub po nim. Dla wszystkich protokołów ważne jest, aby wykazać, że proliferacja komórek zaszła zarówno w hodowlach kontrolnych, jak i w hodowlach poddanych działaniu substancji, a także należy oszacować zakres cytotoksyczności wywołanej przez badaną substancję chemiczną lub cytostazy we wszystkich kulturach, które analizuje się pod kątem występowania mikrojąder.

OPIS METODY

Komórki

Można wykorzystać pierwotne hodowle limfocytów krwi obwodowej pochodzących od ludzi lub od innych ssaków (7) (20) (46) (47) oraz szereg linii komórkowych pochodzących od gryzoni, takich jak CHO, V79, CHL/IU i L5178Y, lub linie komórkowe pochodzące od ludzi, np. (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (zob. pkt 6). Do celów testów mikrojądrowych wykorzystywano również inne linie komórkowe, takie jak HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), komórki HepG2 (52) (53), A549 oraz pierwotne komórki zarodka chomika syryjskiego (54), jednak na chwilę obecną nie zostały one poddane walidacji w szerszym zakresie. Stosowanie tych linii komórkowych i rodzajów komórek powinno być zatem uzasadnione na podstawie ich wykazanej efektywności w badaniu, jak opisano w sekcji poświęconej kryteriom dopuszczalności. Jak donoszono, cytochalazyna B może potencjalnie wpływać na wzrost komórek L5178Y, dlatego też nie zaleca się jej stosowania z tą linią komórkową (23). Jeżeli stosowane są komórki pierwotne, ze względu na dobrostan zwierząt należy rozważyć użycie komórek pochodzących od ludzi, jeżeli jest to możliwe; należy je pobrać w zgodzie z zasadami etycznymi i przepisami mającymi zastosowanie do ludzi.

Ludzkie limfocyty krwi obwodowej należy pozyskiwać od młodych (w wieku około 18–35 lat) niepalących osób, u których nie stwierdzono żadnych schorzeń oraz które nie były narażone w ostatnim czasie na czynniki genotoksyczne (tj. substancje chemiczne, promieniowanie jonizujące) w stopniu, który mógłby zwiększyć podstawową częstość występowania komórek mikrojądrowych. Zagwarantuje to niską i stałą podstawową częstość występowania komórek mikrojądrowych. Wyjściowa częstość występowania komórek mikrojądrowych wzrasta wraz z wiekiem, a tendencja ta jest bardziej widoczna u kobiet niż u mężczyzn (55). Jeżeli dla celów stosowania łączy się komórki pochodzące od większej liczby dawców niż jeden, należy wskazać liczbę dawców. Należy wykazać, że komórki uległy podziałowi w okresie od rozpoczęcia poddawania ich działaniu badanej substancji chemicznej do momentu pobrania próbek. Kultury komórkowe utrzymuje się w fazie wzrostu wykładniczego (linie komórkowe) bądź stymuluje się ich podział (pierwotne kultury limfocytów) celem narażenia komórek na działanie badanej substancji chemicznej w różnych stadiach cyklu komórkowego, ponieważ czułość stadiów komórek na badaną substancję chemiczną może być nieznana. Komórki pierwotne, które wymagają stymulacji mitogenami, aby się podzielić, zasadniczo nie podlegają synchronizacji podczas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej (np. limfocyty ludzkie po 48-godzinnej stymulacji mitogenami). Wykorzystywanie zsynchronizowanych komórek podczas podawania badanej substancji chemicznej nie jest zalecane, ale może zostać zaakceptowane w uzasadnionych przypadkach.

Podłoża i warunki hodowli

W celu utrzymania kultur należy zastosować odpowiednie podłoże oraz warunki inkubacji (naczynia do hodowli komórkowych, wilgotne środowisko o zawartości CO_2 5 %, w stosownych przypadkach, oraz temperatura w wysokości 37 °C). Linie komórkowe powinny być rutynowo sprawdzane pod kątem stabilności zmiennej liczby chromosomów oraz nieobecności zanieczyszczenia mykoplazmą, a komórki nie powinny być wykorzystywane, jeżeli są zanieczyszczone lub w przypadku, gdy zmienna liczba chromosomów uległa zmianie. Należy ustalić normalny czas trwania cyklu komórkowego linii komórkowych lub pierwotnych kultur wykorzystywanych w laboratorium badawczym, który powinien być zgodny z opublikowanymi właściwościami komórek (20).

▼M7

Przygotowanie kultur

Linie komórkowe: komórki są rozmnażane z kultur wyjściowych i wysiewane na podłoże w takiej gęstości, by komórki w zawiesinie lub w jednowarstwowej hodowli komórek mogły nadal rosnąć wykładniczo aż do czasu pobrania (np. należy unikać konfluencji w przypadku komórek rosnących w jednowarstwowej hodowli komórek).

Limfocyty: krew pełną z antykoagulantem (np. heparyną) lub oddzielone limfocyty hoduje się (np. przez 48 godzin dla limfocytów ludzkich) w obecności mitogenu (np. fitohemaglutyniny (PHA) dla limfocytów ludzkich) w celu indukcji podziału komórek przed ich narażeniem na działanie badanej substancji chemicznej oraz cytochalazyny B.

Aktywacja metaboliczna

Egzogenne układy metabolizujące należy stosować w przypadku, gdy stosuje się komórki o nieodpowiedniej endogennej wydolności metabolicznej. Najpowszechniej stosowanym układem, który jest domyślnie zalecany, jeżeli nie jest uzasadnione zastosowanie innego systemu, jest frakcja postmitochondrialna suplementowanego kofaktora (S9) przygotowywana z wątroby gryzoni (najczęściej szczurów) otrzymujących czynniki pobudzające enzymy takie jak Aroclor 1254 (56) (57) lub kombinację fenobarbitalu i b-naftoflawonu (58) (59) (60). Ta ostatnia kombinacja nie pozostaje w sprzeczności z Konwencją sztokholmską w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych (61) i okazała się równie skuteczna jak Aroclor 1254 w wywoływaniu oksydaz wieloczynnościowych (58) (59) (60). Frakcja S9 jest zazwyczaj wykorzystywana w stężeniach w zakresie 1–2 % (objętościowo), ale stężenie to może być zwiększone do 10 % (obj.) w końcowym podłożu użytym do badania. Podczas poddawania zwierzęcia czynnikom należy unikać stosowania produktów, które zmniejszają indeks mitotyczny, a zwłaszcza czynników wiążących wapń (62). Klasa badanych substancji chemicznej może mieć wpływ na wybór rodzaju i stężenia egzogennego układu metabolizującego lub czynnika pobudzającego metabolizm.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej

Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuścić w odpowiednich rozpuszczalnikach oraz rozcieńczyć, w stosownych przypadkach, przed poddaniem komórek ich działaniu. Ciekłe substancje chemiczne można dodać do układu badawczego bezpośrednio lub rozcieńczyć przed podaniem do układu badawczego. Gazowe lub lotne substancje chemiczne należy badać za pomocą odpowiednich modyfikacji standardowych protokołów, takich jak poddawanie komórek działaniu substancji badanej w szczelnie zamkniętych naczyniach (63) (64) (65). Preparaty badanej substancji chemicznej należy przygotowywać tuż przed poddaniem komórek jej działaniu, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, iż dopuszczalne jest składowanie substancji.

Warunki badania

Rozpuszczalniki

Rozpuszczalnik należy wybrać tak, aby zoptymalizować rozpuszczalność badanych substancji chemicznych, unikając niepożądanego wpływu na przeprowadzenie badania, tj. zmiany wzrostu komórek, wpływu na spójność badanej substancji chemicznej, reakcji z naczyniami do hodowli komórkowych czy zakłócenia układu metabolizującego. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć zastosowanie wodnego rozpuszczalnika (lub podłoża). Sprawdzonymi rozpuszczalnikami są woda lub sulfotlenek dimetylu (DMSO). Zasadniczo zawartość rozpuszczalników organicznych nie powinna przekraczać 1 % (obj.). Jeżeli cytochalazyna B jest rozpuszczona w sulfotlenku dimetylu, całkowita ilość rozpuszczalnika organicznego używanego zarówno dla badanej substancji chemicznej, jak i cytochalazyny B nie powinna przekraczać 1 % (obj.); w przeciwnym razie należy zastosować próby kontrolne niepoddane działaniu substancji, aby upewnić się, że zawartość procentowa rozpuszczalnika organicznego nie wykazuje szkodliwego działania. Zawartość rozpuszczalników wodnych

▼M7

(soli fizjologicznej lub wody) w końcowym podłożu użytym do badania nie powinna przekroczyć 10 % (obj.). Jeżeli używane są inne rozpuszczalniki niż sprawdzone rozpuszczalniki (np. etanol czy aceton), ich użycie powinno być uzasadnione danymi, które potwierdzają ich zgodność z badaną substancją chemiczną, układem badawczym oraz brak toksyczności genetycznej w zastosowanym stężeniu. W razie braku takich danych potwierdzających należy uwzględnić próby kontrolne niepoddawane działaniu substancji (zob. dodatek 1) oraz próby kontrolne z rozpuszczalnikiem w celu wykazania, że wybrany rozpuszczalnik nie wywołuje skutków szkodliwych lub wpływających na chromosomy (np. aneuploidia lub klastogenność).

Wykorzystanie cytochalazyny B jako inhibitora cytokinezy

Jedną z najistotniejszych kwestii przy przeprowadzaniu testu MNvit jest zapewnienie, aby zliczane komórki przeszły mitozę podczas poddawania działaniu badanej substancji chemicznej lub w okresie po poddaniu, jeżeli jest stosowany. Z tego względu liczenie mikrojąder należy ograniczyć do komórek, które przeszły mitozę w trakcie ich poddawania działaniu badanej substancji chemicznej lub po nim. Cytochalazyna B to czynnik, który jest najpowszechniej stosowany do celów inhibicji cytokinezy, ponieważ hamuje on polimeryzację aktyny, a tym samym zapobiega oddzielaniu komórek potomnych po mitozie, doprowadzając do powstawania komórek dwujądrowych (6) (66) (67). W przypadku stosowania cytochalazyny B wpływ badanej substancji chemicznej na kinetykę proliferacji komórek można mierzyć jednocześnie. Cytochalazyna B powinna być wykorzystywana jako inhibitor cytokinezy w przypadku stosowania ludzkich limfocytów, ponieważ czas trwania cyklu komórkowego będzie różny dla różnych dawców oraz ze względu na to, że nie wszystkie limfocyty będą reagować na stymulację PHA. Wykorzystanie cytochalazyny B nie jest obowiązkowe dla innych rodzajów komórek, jeżeli można stwierdzić, że przeszły one podział, jak opisano w pkt 27. Ponadto cytochalazyna B nie jest zasadniczo stosowana, jeżeli próbki są oceniane pod względem mikrojąder z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej.

Laboratorium powinno ustalić odpowiednie stężenie cytochalazyny B dla każdego rodzaju komórek w celu uzyskania optymalnej częstości występowania komórek dwujądrowych w kulturach kontrolnych z rozpuszczalnikiem oraz wykazać, że to stężenie doprowadzi do produkcji wystarczającej liczby komórek dwujądrowych dla celów oceny. Odpowiednie stężenie cytochalazyny B zwykle wynosi 3–6 μg/ml (19).

Pomiar proliferacji komórek i cytotoksyczności oraz wybór badanych stężeń

Przy ustalaniu najwyższego stężenia badanej substancji chemicznej należy unikać stężeń, które mogą dawać zniekształcone wyniki dodatnie, np. stężeń powodujących nadmierną cytotoksyczność (zob. pkt 29), strącanie substancji w podłożu (zob. pkt 30) i znaczne zmiany pH lub osmolalności (zob. pkt 9). Jeżeli badana substancja chemiczna powoduje znaczną zmianę pH podłoża w momencie dodania, pH może zostać dopasowane poprzez buforowanie końcowego podłoża użytego do badania, aby uniknąć zniekształconych wyników dodatnich i utrzymać odpowiednie warunki hodowli.

Dokonuje się pomiaru proliferacji komórek, aby upewnić się, że odpowiednia liczba komórek poddanych działaniu substancji przeszła mitozę podczas testu oraz że substancja chemiczna jest podawana przy odpowiednim poziomie cytotoksyczności (zob. pkt 29). Cytotoksyczność powinna zostać określona w ramach głównego doświadczenia z użyciem aktywacji metabolicznej lub bez niej, przy wykorzystaniu odpowiedniego wskazania dotyczącego śmierci i wzrostu komórek (zob. pkt 26 i 27). Chociaż ocena cytotoksyczności w badaniu wstępnym może być przydatna w lepszym określeniu stężeń, które mają zostać użyte w głównym doświadczeniu, badanie wstępne nie jest obowiązkowe. Jeżeli taka ocena zostanie przeprowadzona, nie może ona zastąpić pomiaru cytotoksyczności w głównym doświadczeniu.

Podawanie hodowlom cytochalazyny B i pomiar względnych częstości występowania komórek jednojądrowych, dwujądrowych i wielojądrowych w hodowli stanowi precyzyjną metodę ilościowego określania wpływu na proliferację komórek oraz działania cytotoksycznego lub cytostatycznego badanej substancji (6) oraz zapewnia mikroskopowe liczenie jedynie tych komórek, które podzieliły się podczas podawania substancji lub po jej podaniu. W celu oszacowania działania cytotoksycznego lub cytostatycznego badanej substancji przez porównanie

▼M7

wartości w kulturach poddanych działaniu substancji oraz w kulturach kontrolnych należy zastosować wskaźnik proliferacji blokera cytokinezy (CBPI) (6) (27) (68) lub wskaźnik replikacji (RI) oparte na co najmniej 500 komórkach na kulturę (zob. wzory w dodatku 2). Ocena innych wskaźników cytotoksyczności (np. integralność komórki, apoptoza, martwica, liczenie w stadium metafazy, cykl komórkowy) może dostarczyć użytecznych informacji, ale nie powinna być stosowana zamiast CBPI czy RI.

W badaniach przeprowadzonych bez udziału cytochalazyny B należy wykazać, że komórki w kulturze uległy podziałowi, tak aby znaczny odsetek zliczanych komórek uległ podziałowi w trakcie poddania działaniu badanej substancji chemicznej lub po nim; w przeciwnym razie można uzyskać wyniki fałszywie ujemne. Zaleca się pomiar względnego podwojenia populacji (RPD) oraz względnego wzrostu liczby komórek (RICC) celem oszacowania cytotoksycznego lub cytostatycznego działania badanej substancji (17) (68) (69) (70) (71) (zob. wzory w dodatku 2). W przypadku rozszerzonych okresów pobierania próbek (tj. poddawanie komórek działaniu substancji chemicznej przez 1,5–2-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego, przez co okresy pobierania próbek trwają ogółem dłużej niż 3–4-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego, jak opisano w pkt 38 i 39) RPD może spowodować niedoszacowanie cytotoksyczności (71). W takich warunkach RICC może być lepszą miarą; pomocne oszacowanie może również zapewnić ocena cytotoksyczności po upływie 1,5–2-krotności czasu trwania cyklu komórkowego. Ocena innych wskaźników cytotoksyczności lub cytostazy (np. integralności komórki, apoptozy, martwicy, liczenia w stadium metafazy, wskaźnika proliferacji (PI), cyklu komórkowego, mostków nukleoplazmatycznych lub „pączków” jądrowych) może dostarczyć użytecznych dodatkowych informacji, ale nie powinna być stosowana zamiast RPD czy RICC.

Należy ocenić co najmniej trzy badane stężenia (poza kontrolami z rozpuszczalnikiem i kontrolami dodatnimi), które spełniają kryteria dopuszczalności (odpowiednia cytotoksyczność, liczba komórek itp.). Bez względu na rodzaj komórek (linie komórkowe bądź pierwotne kultury limfocytów) przy każdym badanym stężeniu można stosować zarówno zduplikowane, jak i pojedyncze kultury poddane działaniu substancji. Mimo że zalecane jest stosowanie zduplikowanych kultur, dopuszczalne jest również stosowane pojedynczych kultur, pod warunkiem że policzono taką samą całkowitą liczbę komórek w przypadków zarówno kultur pojedynczych, jak i zduplikowanych. Zastosowanie pojedynczych kultur jest szczególnie uzasadnione, jeżeli ocenie poddaje się więcej niż 3 stężenia (zob. pkt 44–45). Wyniki uzyskane na podstawie niezależnych zduplikowanych kultur przy danym stężeniu można łączyć na potrzeby analizy danych. W przypadku badanych substancji chemicznych wykazujących niewielką cytotoksyczność lub niewykazujących żadnej cytotoksyczności na ogół odpowiednie będzie zastosowanie 2–3-krotnych przedziałów stężenia. W przypadku wystąpienia cytotoksyczności wybrane badane stężenia powinny obejmować zakres rozpoczynający od stężenia, które wykazuje cytotoksyczność, jak opisano w pkt 29, oraz uwzględniający stężenia, w których wystąpiła umiarkowana i niewielka cytotoksyczność lub nie wystąpiła żadna cytotoksyczność. Wiele badanych substancji chemicznych wykazuje gwałtowny wzrost krzywych stężenie-odpowiedź, w związku z czym aby uzyskać dane przy niskiej i umiarkowanej cytotoksyczności lub aby szczegółowo zbadać zależność dawka-odpowiedź, konieczne będzie zastosowanie stężeń o bardziej zbliżonych wartościach lub więcej niż trzech stężeń (kultury pojedyncze lub zduplikowane), w szczególności w sytuacjach, w których wymagane jest powtórzenie doświadczenia (zob. pkt 60).

Jeżeli maksymalne stężenie opiera się na cytotoksyczności, najwyższe stężenie powinno dążyć do osiągnięcia cytotoksyczności na poziomie 55 ± 5 % przy wykorzystaniu zalecanych parametrów cytotoksyczności (tj. zmniejszenie RICC i RPD dla linii komórkowych, jeżeli nie jest stosowana cytochalazyna B, i zmniejszenie CBPI lub RI, jeżeli cytochalazyna B jest stosowana w przypadku 45 ± 5 % jednoczesnych kontroli ujemnych) (72). Należy zachować ostrożność w interpretowaniu wyników dodatnich, które wystąpiły wyłącznie w górnym przedziale tego zakresu cytotoksyczności 55 ± 5 % (71).

▼M7

Dla słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych, które nie wykazują cytotoksyczności w stężeniach niższych od najniższego stężenia nierozpuszczalnego, najwyższe badane stężenie powinno spowodować mętność lub osad widoczny gołym okiem lub przez mikroskop odwrócony pod koniec podawania badanej substancji chemicznej. Nawet jeżeli cytotoksyczność wystąpi dla stężeń powyżej najniższego stężenia nierozpuszczalnego, zaleca się przeprowadzenie testu tylko dla jednego stężenia powodującego mętność bądź wytrącenie się widocznego osadu, ponieważ osad może spowodować pojawienie się wyników zniekształconych. W przypadku stężenia powodującego powstanie osadu należy zadbać o to, aby pojawienie się osadu nie zakłóciło przebiegu testu (np. barwienia lub oceny). Pomocne może się okazać określenie rozpuszczalności podłoża przed wykonaniem doświadczenia.

Jeżeli nie zaobserwowano żadnego osadu ani ograniczenia cytotoksyczności, najwyższe badane stężenie powinno odpowiadać 10 mM, 2 mg/ml lub 2 µl/ml w zależności od tego, która z tych wartości jest najniższa (73) (74) (75). Jeżeli badana substancja chemiczna nie ma określonego składu, np. substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne (UVCB) (76), wyciągi pochodzące ze środowiska itp., może być konieczne podwyższenie (np. do 5 mg/ml) najwyższego stężenia w przypadku braku dostatecznej cytotoksyczności, tak aby zwiększyć stężenie każdego ze składników. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że wymagania te mogą się różnić w przypadku produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi (93).

Kontrole

Dla każdego czasu pobrania należy włączyć jednoczesną kontrolę ujemną (zob. pkt 21) obejmującą sam rozpuszczalnik w podłożu użytym do badania; w ramach tej kontroli test przeprowadza się w identyczny sposób jak w przypadku kultur poddanych działaniu substancji.

Jednoczesna kontrola dodatnia jest konieczna, aby wykazać zdolność laboratorium do zidentyfikowania klastogenów i aneugenów w warunkach określonych w stosowanym protokole badania oraz skuteczność egzogennego układu metabolizującego (w stosownych przypadkach). Przykładowe substancje służące do kontroli dodatniej są przedstawione poniżej w tabeli 1. W uzasadnionych przypadkach dopuszcza się zastosowanie alternatywnych substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej.

W chwili obecnej nie są znane aneugeny wymagające aktywacji metabolicznej w celu wykazania działania genotoksycznego (17). Ponieważ testy na komórkach ssaków *in vitro* pod kątem toksyczności genetycznej są w dostatecznym stopniu ustandaryzowane, jeżeli chodzi o krótkoterminowe poddanie działaniu substancji chemicznej przeprowadzane jednocześnie z aktywacją metaboliczną i bez niej, zastosowanie kontroli dodatniej można ograniczyć do klastogenu wymagającego aktywacji metabolicznej. W tym przypadku pojedyncza reakcja klastogenna w ramach kontroli dodatniej wykaże zarówno aktywność układu metabolizującego, jak i reaktywność układu badawczego. W przypadku długoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej (bez S9) należy zastosować jednak oddzielną kontrolę dodatnią, ponieważ czas podawania badanej substancji chemicznej będzie się różnił od czasu w badaniu z wykorzystaniem aktywacji metabolicznej. Jeżeli klastogen został wybrany jako pojedyncza kontrola dodatnia dla krótkoterminowego poddawania działaniu badanej substancji chemicznej z aktywacją metaboliczną i bez niej, w przypadku poddawania długoterminowego bez aktywacji metabolicznej należy wybrać aneugen. W przypadku komórek wydolnych metabolicznie niewymagających użycia S9 należy zastosować kontrolę dodatnią zarówno pod kątem klastogenności, jak i aneugenności.

Każdą kontrolę dodatnią należy zastosować przy co najmniej jednym stężeniu, od którego oczekuje się wytworzenia odtwarzalnego oraz wykrywalnego wzrostu wykraczającego poza poziom wyjściowy, w celu wykazania czułości układu badawczego (tj. efekty są jasne, ale nie ujawniają badającemu bezpośrednio tożsamości zakodowanych szkiełek mikroskopowych), a reakcja nie powinna być zakłócona cytotoksycznością wykraczającą poza limity określone w niniejszej metodzie badawczej.

▼M7

Tabela 1

Chemiczne substancje odniesienia zalecane do oceny biegłości laboratorium oraz do wyboru substancji do kontroli dodatniej

Kategoria	Substancja chemiczna	Numer CAS
1. **Klastogeny aktywne bez aktywacji metabolicznej**		
	Metanosulfonian metylu	66-27-3
	Mitomycyna C	50-07-7
	N-tlenek 4-nitrochinoliny	56-57-5
	Arabinozyd cytozyny	147-94-4
2. **Klastogeny wymagające aktywacji metabolicznej**		
	Benzo[a]piren	50-32-8
	Cyklofosfamid	50-18-0
3. **Aneugeny**		
	Kolchicyna	64-86-8
	Winblastyna	143-67-9

PROCEDURA

Harmonogram podawania substancji chemicznej

Aby zmaksymalizować prawdopodobieństwo wykrycia aneugenu lub klastogenu oddziałującego na określonych etapach cyklu komórkowego, konieczne jest poddanie wystarczającej liczby komórek działaniu badanej substancji chemicznej na wszystkich poszczególnych etapach ich cykli komórkowych. Każde poddanie działaniu substancji chemicznej powinno rozpocząć się i zakończyć w momencie, w którym komórki rosną wykładniczo; komórki powinny nadal rosnąć aż do czasu pobrania próbek. Harmonogram podawania substancji chemicznej dla linii komórkowych i pierwotnych hodowli komórek może zatem różnić się nieco od harmonogramu stosowanego w przypadku limfocytów, które wymagają stymulacji mitogenami, aby rozpocząć swój cykl komórkowy (17). W przypadku limfocytów najefektywniejszym podejściem jest rozpoczęcie poddawania działaniu badanej substancji chemicznej po upływie 44–48 godzin od stymulacji PHA, kiedy to komórki będą się dzielić asynchronicznie (6).

Opublikowane dane (19) wskazują, że większość aneugenów i klastogenów jest wykrywana w okresie krótkoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej wynoszącym 3–6 godzin w obecności i w braku frakcji S9, po którym następuje usunięcie badanej substancji chemicznej i pobranie próbek w czasie równoważnym około 1,5–2-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji (7).

W celu gruntownej oceny, która jest niezbędna do potwierdzenia wyniku ujemnego, należy jednak przeprowadzić doświadczenie we wszystkich trzech następujących warunkach doświadczalnych z zastosowaniem krótkoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej z aktywacją metaboliczną i bez niej oraz długoterminowego poddawania działaniu substancji bez aktywacji metabolicznej (zob. pkt 56, 57 i 58):

— komórki należy poddawać działaniu badanej substancji chemicznej bez aktywacji metabolicznej przez 3–6 godzin, a następnie należy pobrać próbki w czasie równoważnym około 1,5–2-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji (19);

— komórki należy poddawać działaniu badanej substancji chemicznej z użyciem aktywacji metabolicznej przez 3–6 godzin, a następnie należy pobrać próbki w czasie równoważnym około 1,5–2-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji (19);

▼M7

— komórki powinny być nieprzerwanie poddawane działaniu badanej substancji chemicznej bez aktywacji metabolicznej aż do pobrania próbek w czasie równoważnym około 1,5–2-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego.

Jeżeli którekolwiek z powyższych warunków doświadczalnych wywołały reakcję dodatnią, badanie któregokolwiek z pozostałych schematów poddawania działaniu substancji chemicznej może okazać się zbędne.

Jeżeli wiadomo lub podejrzewa się, że badana substancja chemiczna wpływa na czas cyklu komórkowego (np. podczas badania analogów nukleozydowych), zwłaszcza w odniesieniu do komórek posiadających białko p53 (35) (36) (77), można wydłużyć czas pobierania próbek lub ustania działania substancji maksymalnie o kolejną 1,5–2-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego (tj. ogółem 3–4-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego od rozpoczęcia krótko- i długoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej). Z tych opcji można korzystać w sytuacjach, w których może istnieć obawa co do możliwych interakcji między badaną substancją chemiczną a cytochalazyną B. Podczas stosowania wydłużonych okresów pobierania próbek (tj. całkowity czas hodowli wynoszący 3–4-krotność czasu trwania cyklu komórkowego) należy zadbać, aby komórki wciąż aktywnie się dzieliły. Przykładowo wzrost wykładniczy limfocytów może spadać po 96 godzinach od stymulacji, a jednowarstwowe hodowle komórek mogą się zlać.

Zalecane harmonogramy podawania substancji chemicznej zestawiono w tabeli 2. Te ogólne harmonogramy podawania substancji chemicznej można modyfikować (i należy podać uzasadnienie) w zależności od stabilności lub reaktywności badanej substancji chemicznej lub określonych właściwości wzrostowych stosowanych komórek.

Tabela 2

Czas poddawania komórek działaniu substancji chemicznej i czas pobrania w przypadku testu MNvit

Limfocyty, komórki pierwotne i linie komórkowe poddawane działaniu substancji w obecności cytochalazyny B	+ S9 Krótkie poddawanie	Poddawać działaniu przez 3–6 godzin w obecności S9; usunąć S9 oraz podłoże użyte do badania; dodać świeże podłoże i cytochalazynę B; pobierać przez 1,5–2-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji.
	– S9 Krótkie poddawanie	Poddawać działaniu substancji przez 3–6 godzin; usunąć podłoże użyte do badania; dodać świeże podłoże i cytochalazynę B; pobierać przez 1,5–2-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji.
	– S9 Wydłużone poddawanie	Poddawać działaniu substancji przez 1,5–2-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego w obecności cytochalazyny B; pobierać po zakończeniu okresu poddawania działaniu substancji.
Linie komórkowe poddawane działaniu substancji bez cytochalazyny B (identyczne z przedstawionymi powyżej harmonogramami podawania substancji chemicznej, z tym że nie dodaje się cytochalazyny B)		

W przypadku jednowarstwowych hodowli komórek po zakończeniu 3–6 godzin poddawania działaniu substancji mogą być obecne komórki mitotyczne (można je rozpoznać po okrągłym kształcie i fakcie, że oddzielają się od powierzchni). Z uwagi na łatwość oddzielania się komórek mitotycznych można je utracić w momencie usuwania podłoża zawierającego badaną substancję chemiczną. Jeżeli istnieją dowody na znaczny wzrost liczby komórek mitotycznych w porównaniu z próbami kontrolnymi, co wskazuje na prawdopodobieństwo zatrzymania mitozy, należy zebrać komórki poprzez odwirowanie i dodać je z powrotem do hodowli, aby uniknąć utraty w trakcie czasu poboru komórek w fazie mitozy zagrożonych aberracjami mikrojądrowymi i chromosomowymi.

▼M7

Pobieranie komórek i przygotowywanie preparatów

Każdą kulturę należy pobrać oddzielnie i oddzielnie poddać działaniu substancji. Przygotowanie komórek może obejmować hipotoniczne przetwarzanie komórek, ale etap ten nie jest konieczny, jeżeli w inny sposób osiągnięto odpowiednie rozprowadzenie komórek. Można stosować różne techniki przygotowywania preparatów, pod warunkiem że uzyskuje się wysokiej jakości preparaty komórkowe do celów liczenia. Komórki z nienaruszoną błoną komórkową i nienaruszoną cytoplazmą należy zatrzymać, aby umożliwić wykrycie mikrojąder oraz (w metodzie z wykorzystaniem blokera cytokinezy) wiarygodne zidentyfikowanie komórek dwujądrowych.

Preparaty można barwić przy użyciu różnych metod, takich jak metoda Giemsy lub fluorescencyjne barwniki specyficzne dla DNA. Wykorzystanie odpowiednich barwników fluorescencyjnych (np. oranżu akrydyny (78) lub Hoechst 33258 oraz pyroniny-Y (79)) może wyeliminować niektóre spośród artefaktów związanych ze stosowaniem barwnika niebędącego barwnikiem specyficznym dla DNA. Jeżeli informacje mechanistyczne dotyczące powstawania mikrojąder są przedmiotem zainteresowania, w celu określenia zawartości mikrojądra (całe chromosomy zostaną wybarwione, natomiast acentryczne fragmenty chromosomów nie zostaną wybarwione) można zastosować przeciwciała antykinetochorowe, FISH z sondami molekularnymi specyficznymi dla pancentromerów lub syntezę *in situ* przy udziale startera ze starterami specyficznymi dla pancentromerów, wraz z odpowiednim barwieniem kontrastowym DNA (16) (17). Inne metody rozróżnienia klastogenów i aneugenów można stosować, o ile okazały się skuteczne i zostały zweryfikowane. Przykładowo w przypadku niektórych linii komórkowych pożytecznych informacji mogą dostarczyć również pomiary jąder o liczbie chromosomów < 2n jako zdarzeń hipodiploidalnych przy użyciu technik takich jak analiza obrazowa, laserowa cytometria skaningowa lub cytometria przepływowa (80) (81) (82). Obserwacje morfologii jąder również mogą uwidocznić oznaki możliwej aneuploidii. Ponadto badanie aberracji chromosomowych w stadium metafazy, najlepiej w odniesieniu do komórek tego samego rodzaju i protokołu o podobnej czułości, również może stanowić pomocne narzędzie do określenia, czy mikrojądra powstały w wyniku złamań chromosomów (przy czym należy pamiętać, że badanie aberracji chromosomowych nie wykryje utraty chromosomów).

Analiza

Wszystkie preparaty, w tym te zawierające rozpuszczalnik oraz komórki niepoddane działaniu substancji (jeżeli zostały użyte) lub stanowiące kontrolę dodatnią, należy niezależnie zakodować przed przeprowadzeniem analizy mikroskopowej częstości występowania mikrojąder. Przy stosowaniu automatycznego systemu zliczania, na przykład cytometrii przepływowej, laserowej cytometrii skaningowej lub analizy obrazowej, należy zastosować odpowiednie techniki w celu kontrolowania wszystkich błędów systematycznych lub zniekształceń. Bez względu na to, czy do zliczania mikrojąder używa się platformy automatycznej, należy przeprowadzić jednoczesną ocenę CBPI, RI, RPD lub RICC.

W kulturach poddanych działaniu cytochalazyny B częstości występowania mikrojąder należy analizować w co najmniej 2 000 komórek dwujądrowych na stężenie i próbę kontrolną (83), których liczbę należy podzielić równo pomiędzy kontrpróby, jeżeli takowe są stosowane. W przypadku pojedynczych kultur na dawkę (zob. pkt 28) w takiej pojedynczej kulturze należy zliczyć co najmniej 2 000 komórek dwujądrowych (83) na kulturę. Jeżeli do celów liczenia jest dostępnych znacznie mniej niż 1 000 komórek dwujądrowych przypadających na kulturę (dla zduplikowanych kultur) lub 2 000 (dla pojedynczej kultury) na każde stężenie oraz jeżeli nie wykryto znacznego wzrostu liczby mikrojąder, należy powtórzyć test, stosując więcej komórek lub mniej cytotoksyczne stężenia, w zależności od tego, co jest bardziej właściwe. Należy zwrócić uwagę, by nie liczyć komórek dwujądrowych o nieregularnych kształtach lub gdy obydwa jądra różnią się znacznie pod względem wielkości. Ponadto nie należy mylić komórek

▼M7

dwujądrowych ze źle rozprowadzonymi komórkami wielojądrowymi. Komórki zawierające więcej niż dwa jądra nie powinny analizowane pod kątem mikrojąder, ponieważ podstawowa częstość występowania mikrojąder może być wyższa w przypadku tych komórek (84). Liczenie komórek jednojądrowych jest dopuszczalne, jeżeli wykazano, że badana substancja chemiczna zakłóca aktywność cytochalazyny B. W takich przypadkach pomocne może być powtórzenie testu bez udziału cytochalazyny B. Zliczenie nie tylko komórek dwujądrowych, lecz także jednojądrowych, może być źródłem pożytecznych informacji (85) (86), ale nie jest obowiązkowe.

W liniach komórkowych badanych bez poddania działaniu cytochalazyny B mikrojądra należy zliczyć w co najmniej 2 000 komórek dwujądrowych na stężenie testowe i próbę kontrolną (83), których liczbę należy podzielić równo pomiędzy kontrpróby, jeżeli takowe są stosowane. W przypadku stosowania pojedynczych kultur na stężenie (zob. pkt 28) w takiej pojedynczej kulturze należy zliczyć co najmniej 2 000 komórek na kulturę. Jeżeli do celów liczenia jest dostępnych znacznie mniej niż 1 000 komórek przypadających na kulturę (dla zduplikowanych kultur) lub 2 000 (dla pojedynczej kultury) na każde stężenie oraz jeżeli nie wykryto znacznego wzrostu liczby mikrojąder, należy powtórzyć test, stosując więcej komórek lub mniej cytotoksyczne stężenia, w zależności od tego, co jest bardziej właściwe.

W przypadku stosowania cytochalazyny B należy określić CBPI lub RI, aby ocenić proliferację komórek (zob. dodatek 2), używając co najmniej 500 komórek na kulturę. Jeżeli poddawanie działaniu substancji odbywa się w nieobecności cytochalazyny B, konieczne jest uzyskanie dowodów, że komórki w kulturze uległy podziałowi, jak omówiono w pkt 24–28.

Biegłość laboratorium

Aby ustalić wystarczające doświadczenie laboratorium w zakresie omawianego testu przed zastosowaniem go w rutynowych badaniach, laboratorium powinno wcześniej przeprowadzić szereg doświadczeń z wykorzystaniem substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej działających za pomocą różnych mechanizmów (co najmniej jednej z aktywacją metaboliczną i jednej bez takiej aktywacji oraz jednej działającej za pomocą mechanizmu aneugenicznego, przy czym taką substancję należy wybrać spośród substancji chemicznych zawartych w tabeli 1) oraz różnych rodzajów kontroli ujemnej (uwzględniając kultury niepoddane działaniu substancji chemicznej oraz różne rozpuszczalniki/nośniki). Reakcje otrzymane w wyniku takiej kontroli dodatniej i ujemnej powinny odpowiadać reakcjom opisanym w literaturze. Nie dotyczy to laboratoriów, które dysponują odpowiednim doświadczeniem, tj. laboratoriów prowadzących bazę dostępnych danych historycznych, o której mowa w pkt 49–52.

Aby wykazać biegłość w zakresie wykrywania klastogennych i aneugennych substancji chemicznych, określić skuteczność układu metabolizującego oraz wykazać zasadność procedur liczenia (wizualna analiza mikroskopowa, cytometria przepływowa, laserowa cytometria skaningowa lub analiza obrazu), należy zbadać szereg substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej (zob. tabela 1) przy krótkoterminowym i długoterminowym poddawaniu działaniu substancji chemicznej w przypadku braku aktywacji metabolicznej oraz przy krótkoterminowym poddawaniu działaniu substancji chemicznej w przypadku obecności aktywacji metabolicznej. Należy dobrać szereg stężeń wybranych substancji chemicznych, tak aby uzyskać powtarzalne i powiązane ze stężeniem wzrosty wykraczające poza poziom wyjściowy w celu wykazania czułości i zakresu oznaczania układu badawczego.

Dane historyczne dotyczące kontroli

Laboratorium powinno ustalić:

— zakres i rozkład historycznych wyników kontroli dodatniej,

— zakres i rozkład historycznych wyników kontroli ujemnej (bez poddania działaniu substancji chemicznej, z rozpuszczalnikiem).

Przy pierwszym gromadzeniu danych dotyczących rozkładu historycznych wyników kontroli ujemnej wyniki jednoczesnej kontroli ujemnej powinny być zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli ujemnej, o ile takie dane istnieją. W miarę dodawania kolejnych danych doświadczalnych do rozkładu kontroli jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić

▼M7

się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla tego rozkładu (87) (88). Prowadzona przez dane laboratorium baza danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej powinna wyjściowo zawierać dane z co najmniej 10 doświadczeń, a najlepiej z co najmniej 20 doświadczeń przeprowadzonych w porównywalnych warunkach doświadczalnych. Laboratoria powinny stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (88)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych dotyczących kontroli dodatniej i ujemnej oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest „pod kontrolą" (83). Dalsze zalecenia dotyczące sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych (tj. kryteria włączania danych do zbioru danych historycznych i wykluczania danych z tego zbioru oraz kryteria dopuszczalności dla danego doświadczenia) można znaleźć w literaturze (87).

Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem ich spójności z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wszelkie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli.

Dane dotyczące kontroli ujemnej powinny obejmować częstość występowania komórek z mikrojądrami w pojedynczej kulturze lub w ramach sumy zduplikowanych kultur, jak opisano w pkt 28. Jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla rozkładu danych zawartych w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (87) (88). W przypadku gdy dane dotyczące jednoczesnej kontroli ujemnej nie mieszczą się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 %, włączenie ich do rozkładu kontroli historycznej może być dopuszczalne, pod warunkiem że dane te nie stanowią skrajnych obserwacji nietypowych oraz że istnieją dowody świadczące o tym, iż dany układ badawczy znajduje się „pod kontrolą" (zob. pkt 50), a także dowody wykluczające błąd techniczny czy ludzki.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Przedstawienie wyników

Jeżeli zastosowano technikę z blokerem cytokinezy, indukcję mikrojąder ocenia się wyłącznie na podstawie częstości występowania komórek dwujądrowych z mikrojądrami (niezależnie od liczby mikrojąder przypadających na komórkę). Wyniki liczenia komórek z jednym mikrojądrem, dwoma mikrojądrami lub większą ich liczbą można odnotowywać osobno i mogą one dostarczyć użytecznych informacji, lecz nie jest to obowiązkowe.

Należy odnotowywać jednoczesne pomiary cytotoksyczności lub cytostazy w odniesieniu do wszystkich kultur poddanych działaniu substancji chemicznej, kultur kontroli ujemnej i kultur kontroli dodatniej (16). Należy obliczyć CBPI lub RI dla wszystkich kultur poddanych działaniu substancji chemicznej i kultur kontrolnych jako pomiary opóźnienia cyklu komórkowego przy zastosowaniu metody z blokerem cytokinezy. W przypadku braku cytochalazyny B należy zastosować RPD lub RICC (zob. dodatek 2).

Należy dostarczyć dane dotyczące poszczególnych kultur. Dodatkowo wszystkie dane należy podsumować w postaci tabeli.

Kryteria dopuszczalności

Dopuszczalność testu ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

— uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących jednoczesnej kontroli ujemnej do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej, jak opisano w pkt 50;

— jednoczesne kontrole dodatnie (zob. pkt 50) powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną;

— kryteria proliferacji komórek w kontroli z rozpuszczalnikiem powinny zostać spełnione (pkt 25–27);

— zbadano wszystkie warunki doświadczalne do momentu uzyskania w jednych z nich wyników dodatnich (pkt 36–40);

— można poddać analizie wystarczającą liczbę komórek i stężeń (pkt 28 i 44–46);

▼M7

— kryteria wyboru najwyższego stężenia są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 24–31.

Ocena i interpretacja wyników

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli w dowolnych ze zbadanych warunków doświadczalnych (zob. pkt 36–39):

— co najmniej jedno z badanych stężeń wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną (89),

— ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany z dawką w co najmniej jednych z warunków doświadczalnych (zob. pkt 28).

— którykolwiek wynik znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 52).

W przypadku gdy wszystkie wspomniane kryteria są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna jest w stanie wywołać złamania chromosomu lub zysk albo stratę w danym układzie badawczym. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można również znaleźć w literaturze (90) (91) (92).

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych (zob. pkt 36–39):

— żadne z badanych stężeń nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,

— ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany ze stężeniem,

— wszystkie wyniki mieszczą się w rozkładzie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 52).

Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za niezdolną do wywołania złamania chromosomu ani zysku lub straty w danym układzie badawczym. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można również znaleźć w literaturze (90) (91) (92).

Weryfikacja wyraźnie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

Jeżeli reakcja nie jest ani wyraźnie dodatnia, ani wyraźnie ujemna, jak opisano powyżej, oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku, dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub wyniki dalszych badań. Przydatne może być zliczenie dodatkowych komórek (w stosownych przypadkach) lub powtórne przeprowadzenie doświadczenia, potencjalnie z zastosowaniem zmienionych warunków doświadczalnych (np. odstępów czasu między stężeniami, innych warunków aktywacji metabolicznej (tj. stężenie S9 lub pochodzenie S9)).

W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne i w takiej sytuacji zostanie uznany za niejednoznaczny.

Badane substancje chemiczne powodujące indukcję mikrojąder w teście MNvit mogą wywoływać taki skutek, ponieważ indukują one złamania chromosomu, utratę chromosomu albo zarówno złamania, jak i utratę. W celu ustalenia, czy mechanizm indukcji mikrojąder jest spowodowany aktywnością klastogenną czy aneugenną, można zastosować dalszą analizę z wykorzystaniem przeciwciał antykinetochorowych, sond szczególnych dla centromerów *in situ* lub innych metod.

▼M7

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— źródło, numer partii, data graniczna do użytku, jeżeli jest dostępna;

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;

— reaktywność badanych substancji chemicznych w rozpuszczalniku/nośniku lub w podłożach kultur komórkowych;

— rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane;

— pomiar pH, osmolalności i strącania w podłożu hodowli, do którego dodano badaną substancję chemiczną, w stosownych przypadkach.

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB oraz mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Rozpuszczalnik:

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika;

— zawartość procentowa rozpuszczalnika w końcowym podłożu.

Komórki:

— rodzaj i źródło wykorzystywanych komórek;

— odpowiedniość wykorzystywanych rodzajów komórek;

— nieobecność mykoplazmy w przypadku linii komórkowych;

— w przypadku linii komórkowych – informacje na temat czasu trwania cyklu komórkowego lub wskaźnika proliferacji;

— w przypadku zastosowania limfocytów – płeć, wiek i wszelkie inne istotne informacje na temat dawców krwi, krew pełna lub oddzielone limfocyty, wykorzystany mitogen;

— normalny czas trwania cyklu komórkowego (kontrola ujemna);

— w przypadku linii komórkowych – liczba pasaży, o ile informacje na ten temat są dostępne;

— w przypadku linii komórkowych – metody utrzymania kultur komórkowych;

— w przypadku linii komórkowych – modalna liczba chromosomów.

▼M7

Warunki badania:

— nazwa substancji zatrzymującej cytokinezę (np. cytochalazyna B), o ile jest wykorzystywana, oraz jej stężenie oraz okres narażenia komórek na działanie tej substancji;

— stężenie badanej substancji chemicznej wyrażone jako stężenie końcowe w podłożu (tj. µg lub mg/mL lub mM podłoża);

— uzasadnienie wyboru stężeń oraz liczby kultur, z uwzględnieniem danych dotyczących cytotoksyczności oraz granic rozpuszczalności;

— skład podłoża, w stosownych przypadkach stężenie CO_2, poziom wilgotności;

— stężenie (lub objętość) rozpuszczalnika i badanej substancji chemicznej dodanych do podłoża;

— temperatura i czas inkubacji;

— czas poddawania działaniu substancji chemicznej;

— czas pobrania po podaniu substancji chemicznej;

— w stosownych przypadkach zagęszczenie komórek w czasie osadzania;

— typ oraz skład układu metabolizującego (źródło frakcji S9, metoda przygotowania preparatu frakcji S9, stężenie lub objętość preparatu frakcji S9 i frakcji S9 w końcowym podłożu, kontrole jakości frakcji S9 (tj. aktywność enzymatyczna, sterylność, zdolność metaboliczna));

— substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej i ujemnej, stężenia końcowe, warunki i okresy poddawania działaniu badanej substancji chemicznej i ustania działania substancji;

— metody przygotowywania preparatów oraz stosowane techniki barwienia;

— kryteria liczenia komórek zawierających mikrojądra (wybór komórek poddanych analizie i identyfikacja mikrojądra);

— liczba komórek poddanych analizie;

— metody pomiaru cytotoksyczności;

— wszelkie informacje uzupełniające istotne w kontekście cytotoksyczności i stosowanej metody;

— kryteria uznawania wyników badań za dodatnie, ujemne lub niejednoznaczne;

— stosowana(-e) metoda(-y) analizy statystycznej;

— metody, takie jak stosowanie przeciwciał antykinetochorowych lub sondy specyficzne dla pancentromerów, w celu określenia, czy mikrojądra zawierają całe chromosomy czy fragmenty chromosomów, jeżeli ma to zastosowanie;

— metody stosowane w celu ustalenia poziomu pH, osmolalności i strącania.

Wyniki:

— definicja dopuszczalnych komórek do celów analizy;

— w nieobecności cytochalazyny B – liczba komórek poddanych działaniu substancji chemicznej i liczba komórek pobranych z każdej kultury w przypadku linii komórkowych;

▼M7

— zastosowany pomiar cytotoksyczności, tj. CBPI lub RI w przypadku stosowania metody z blokerem cytokinezy; RICC lub RPD, w przypadku gdy nie są stosowane metody z blokerem cytokinezy; ewentualne inne obserwacje (np. zlewanie się komórek, apoptoza, martwica, liczenie w stadium metafazy, częstość występowania komórek dwujądrowych);

— oznaki strącania i czas oznaczenia;

— dane dotyczące pH oraz osmolalności podłoża użytego do badania, jeżeli zostały ustalone;

— dystrybucja komórek jedno-, dwu- i wielojądrowych, jeżeli stosowana jest metoda z blokerem cytokinezy;

— w stosownych przypadkach liczba komórek z mikrojądrami podana osobno dla każdej kultury poddanej działaniu substancji chemicznej i kultury kontrolnej oraz określenie, czy pochodzą z komórek jedno- czy dwujądrowych;

— w stosownych przypadkach zależność stężenie-odpowiedź;

— dane dotyczące jednoczesnych kontroli ujemnych (z rozpuszczalnikiem) i dodatnich (stężenia i rozpuszczalniki);

— dane historyczne dotyczące kontroli ujemnych (z rozpuszczalnikiem) i dodatnich wraz z zakresami, średnimi i odchyleniami standardowymi oraz granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % rozkładu, uwzględniając również ilość danych;

— analiza statystyczna; ewentualne p-wartości.

Omówienie wyników.

Wnioski.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. Publikacje OECD na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny, nr 234, OECD, Paryż.

(2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* t. 392/1–2, s. 1–4.

(3) Parry, J.M., A. Sors, (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: projekt Wspólnoty Europejskiej dotyczący aneuploidii. *Mutation Research*, t. 287/1, s. 3–15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* t. 43/172–173, s. 233–246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 35/3, s. 167–172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* t. 2/5, s. 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*, t. 161/2, s. 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,* t. 13/1, s. 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*, t. 234/5, s. 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,* t. 6/4, s. 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,* t. 8/4, s. 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*, t. 319/3, s. 205–213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by anti-kinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* t. 8/6, s. 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*, t. 322/1, s. 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*, t. 372/2, s. 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*, t. 372/2, s. 211–219.

(17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, t. 540/2, s. 153–163.

(18) Rozdział B.10 niniejszego załącznika: *Test aberracji chromosomowej w komórkach ssaków in vitro*.

(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*, t. 607/1, s. 13–36.

(20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, t. 607/1, s. 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*, t. 607/1, s. 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*, t. 607/1, s. 88–124.

(23) Oliver, J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, t. 607/1, s. 125–152.

(24) Albertini, S. *et al.* (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* t. 392/1-2, s. 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,* t. 392/1-2, s. 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,* t. 410, s. 81–116.

(27) Kalweit, S. *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* t. 439/2, s. 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,* t. 445/1, s. 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, t. 468/2, s. 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,* t. 517/1–2, s. 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,* t. 14/6, s. 569–580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Specjalne wydanie: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* t. 607/1, s. 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, t. 702/2, s. 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, t. 59/1, s. 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*, t. 52/5, s. 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,* t. 347/3–4, s. 105–115.

(37) ECVAM (2006). Oświadczenie Europejskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM) Naukowego Komitetu Doradczego (ESAC) dotyczące naukowej zasadności testu mikrojądrowego *in vitro* jako alternatywy dla testu aberracji chromosomowych *in vitro* na potrzeby badania genotoksyczności. 25. konferencja ESAC, dnia 16–17 listopada 2006 r.; dostępne na stronie: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(38) ESAC (2006). Wzajemna ocena Naukowego Komitetu Doradczego ECVAM (ESAC), Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Dostępna na stronie internetowej: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* t. 23/4, s. 271–283.

(40) Opracowanie ILSI (projekt). 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. Sprawozdanie 9. grupy zadaniowej ICMPEMC. *Mutation Research,* t. 257/2, s. 147–205.

(42) Morita, T. *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research,* t. 268/2, s. 297–305.

(43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, t. 8/6, s. 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,* t. 634/1–2, s. 177–183.

(45) Nesslany, F. *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, t. 49, s. 439–452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* t. 147/1–2, s. 29–36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* t. 392, s. 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*, t. 62/6, s. 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*, t. 51/3, s. 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*, t. 25/6, s. 555–560.

(51) Josse, R. *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, t. 27/3, s. 295–304.

(52) Ehrlich, V. *et al.* (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* t. 17/3, s. 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,* t. 198/1–3, s. 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,* t. 392/1–2, s. 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,* t. **37/1**, s. 31–45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* t. 113/3–4, s. 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,* t. 4/1, s. 55–65.

▼M7

(58) Elliott, B.M. *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* t. 7, s. 175–177.

(59) Matsushima, T. *et al.* (1976). „A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", w: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. *et al.* (red.), Elsevier, North-Holland, s. 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,* t. 28, s. 51–59.

(61) UNEP (2001). Konwencja Sztokholmska w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych, Program Narodów Zjednoczonych ds. Ochrony Środowiska (UNEP). Dostępne na stronie internetowej: 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*, t. 190/3, s. 225–228.

(63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", w: Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (red.), Plenum, Nowy Jork, s. 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*, t. 5/6, s. 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*, t. 652/2, s. 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,* t. 285/1, s. 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,* t. 521/1–2, s. 103–112.

(68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004). Sprostowanie do „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,* t. 655/1–2, s. 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,* t. 341/3, s. 169–184.

(71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, t. 724, s. 86–87.

(72) Pfuhler, S. *et al.* (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, t. 723/2, s. 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 (wytyczne dotyczące badań 473, 476 i 487). ENV/JM/TG(2014)17. Dostępny na wniosek.

▼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*, t. 741, s. 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*, t. 54/1, s. 36–43.

(76) EPA, Urząd ds. Bezpieczeństwa Substancji Chemicznych i Zapobiegania Zanieczyszczeniom (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, t.*746/1, s. 29–34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* t. 120/4, s. 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,* t. 120/4, s. 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*, t. 52/4, s. 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*, t. 52/5, s. 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*, t. 25/1, s. 33–40.

(83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 198, OECD Publishing, Paryż.

(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,* t. 534/1–2, s. 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*, t. 13/2, s. 193–198.

(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,* t. 85/8, s. 873–899.

(87) Hayashi, M. *et al.* (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t.723/2, s. 87–90.

(88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. wyd. II, John Wiley and Sons, Nowy Jork.

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). „*In vitro* micronucleus test", w: *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, wyd. II, Chow, S. (red.), Marcel Dekker, Inc. Nowy Jork, s. 463–467.

(90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, wyd. III, John Wiley & Sons, Nowy Jork.

(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*, t. 10/suplement 10, s. 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. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICJE

Aneugen: każda substancja chemiczna lub proces, który poprzez reakcję z elementami mitotycznego i mejotycznego cyklu podziału komórek prowadzi do aneuploidii w komórkach lub organizmach.

Aneuploidia: wszelkie odchylenia od zwykłej diploidalnej (lub haploidalnej) liczby chromosomów w pojedynczym chromosomie lub w większej ich liczbie, ale nie w całym zestawie czy całych zestawach chromosomów (poliploidalność).

Apoptoza: zaprogramowana śmierć komórki, na którą składa się szereg etapów prowadzących do rozpadu komórek w cząstki otoczone błoną, które są następnie eliminowane przez fagocytozę lub wydalane.

Proliferacja komórek: wzrost liczby komórek w wyniku mitotycznego podziału komórek.

Centromer: region DNA chromosomu, w którym obydwie chromatydy się łączą i do którego obydwa kinetochory są przyłączone jeden obok drugiego.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Stężenia: odnoszą się do stężeń końcowych badanej substancji chemicznej w podłożu.

Klastogen: każda substancja chemiczna lub każde zdarzenie, które powoduje strukturalne aberracje chromosomowe w populacjach komórek lub organizmów eukariotycznych.

Cytokineza: proces podziału komórki następujący bezpośrednio po mitozie, mający na celu utworzenie dwóch komórek potomnych, z których każda zawiera jedno jądro.

Wskaźnik proliferacji blokera cytokinezy (CBPI): odsetek komórek w cyklu drugiego podziału w populacji poddanej działaniu substancji w stosunku do próby kontrolnej niepoddanej działaniu substancji (zob. wzór w dodatku 2).

Cytostaza: hamowanie wzrostu komórek (zob. wzór w dodatku 2).

Cytotoksyczność: w odniesieniu do badań objętych niniejszą metodą badawczą przeprowadzanych w obecności cytochalazyny B cytotoksyczność określa się jako obniżenie wskaźnika proliferacji blokera cytokinezy (CBPI) lub obniżenie wskaźnika replikacji (RI) komórek poddanych działaniu substancji w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 26 i dodatek 2).

W odniesieniu do badań objętych niniejszą metodą badawczą przeprowadzanych w nieobecności cytochalazyny B cytotoksyczność określa się jako obniżenie względnego podwojenia populacji (RPD) lub obniżenie względnego wzrostu liczby (RICC) komórek poddanych działaniu substancji w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 27 i dodatek 2).

Genotoksyczny: ogólny termin odnoszący się do wszelkiego rodzaju uszkodzeń DNA lub chromosomu, w tym złamań, delecji, adduktów, modyfikacji i sprzężeń nukleotydów, rearanżacji, mutacji genowych, aberracji chromosomowych oraz aneuploidii. Nie wszystkie rodzaje efektów genotoksycznych powodują mutacje lub stałe uszkodzenia chromosomu.

Komórki w interfazie: komórki niebędące w fazie mitozy.

Kinetochor: struktura zawierająca białko na centromerze chromosomu, do której przyczepiają się włókna wrzeciona kariokinetycznego w trakcie podziału komórki, umożliwiając uporządkowane przemieszczanie się chromosomów potomnych do biegunów komórek potomnych.

▼M7

Mikrojądra: małe jądra, oddzielone oraz występujące dodatkowo w stosunku do jądra głównego komórek, wytwarzane w trakcie telofazy mitozy lub mejozy przez fragmenty chromosomów opóźnionych lub całe chromosomy.

Mitoza: podział jądra komórkowego, na który zazwyczaj składają się profaza, prometafaza, metafaza, anafaza i telofaza.

Indeks mitotyczny: stosunek komórek w metafazie do całkowitej liczby komórek zaobserwowanych w populacji komórek; wskazanie stopnia proliferacji komórek tej populacji.

Mutagenny: tworzy dziedziczne zmiany w sekwencji lub sekwencjach par zasad DNA w genach lub w strukturze chromosomów (aberracje chromosomowe).

Nondysjunkcja: nierozdzielenie się pary chromatyd i brak odpowiedniego ich rozdziału do komórek potomnych, w wyniku czego powstają komórki potomne z nieprawidłową liczbą chromosomów.

Status p53: białko p53 bierze udział w procesie regulacji cyklu komórkowego, apoptozy i naprawy DNA. Komórki, w których odnotowuje się niedobór białka p53 i które są niezdolne do zatrzymania cyklu komórkowego lub do usunięcia uszkodzonych komórek poprzez apoptozę lub inne mechanizmy (np. poprzez zainicjowanie procesu naprawy DNA) powiązane z funkcjami, jakie białko p53 pełni w reakcji na uszkodzenie DNA, powinny teoretycznie być bardziej podatne na mutacje genowe lub aberracje chromosomowe.

Poliploidalność: aberracje liczby chromosomów w komórkach lub organizmach, obejmujące cały zestaw lub całe zestawy chromosomów, a nie pojedynczy chromosom lub chromosomy (aneuploidia).

Wskaźnik proliferacji (PI): metoda pomiaru cytotoksyczności, kiedy nie stosuje się cytochalazyny B (zob. wzór w dodatku 2).

Względny wzrost liczby komórek (RICC): metoda pomiaru cytotoksyczności, kiedy nie stosuje się cytochalazyny B (zob. wzór w dodatku 2).

Względne podwojenie populacji (RPD): metoda pomiaru cytotoksyczności, kiedy nie stosuje się cytochalazyny B (zob. wzór w dodatku 2).

Wskaźnik replikacji (RI): odsetek zakończonych cykli podziału komórkowego w hodowli poddanej działaniu substancji w stosunku do próby kontrolnej niepoddanej działaniu substancji w okresie narażenia i ustania działania substancji (zob. wzór w dodatku 2).

Frakcja S9 uzyskana z wątroby: supernatant z homogenatu wątroby po odwirowaniu przy 9 000 g, tj. surowy ekstrakt z wątroby.

Preparat frakcji S9: preparat złożony z frakcji S9 uzyskanej z wątroby i kofaktorów niezbędnych do aktywności metabolicznej enzymów.

Kontrola z rozpuszczalnikiem: ogólny termin opisujący kultury kontrolne otrzymujące wyłącznie rozpuszczalnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Próba kontrolna niepoddawana działaniu substancji: hodowle, które nie są poddawane działaniu żadnej substancji (tj. badanej substancji chemicznej ani rozpuszczalnika), lecz które są równolegle przetwarzane w taki sam sposób jako hodowle otrzymujące badaną substancję chemiczną.

▼M7

Dodatek 2

WZORY DO OCENY CYTOTOKSYCZNOŚCI

W przypadku stosowania cytochalazyny B ocena cytotoksyczności powinna opierać się na **wskaźniku proliferacji blokera cytokinezy (CBPI)** lub **na wskaźniku replikacji (RI)** (17) (69). Wskaźnik proliferacji blokera cytokinezy (CBPI) wskazuje średnią liczbę jąder przypadających na komórkę i może być stosowany do obliczania proliferacji komórek. Wskaźnik replikacji (RI) wskazuje względną liczbę cyklów komórkowych na jedną komórkę podczas okresu narażenia na działanie cytochalazyny B w hodowlach poddanych działaniu substancji w porównaniu z hodowlami kontrolnymi i może być wykorzystywany do obliczania cytostazy w %:

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

gdzie:

T = hodowla poddana działaniu badanej substancji chemicznej

C = hodowla kontrolna

gdzie:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{l. komórek jednojądrowych}) + (2 \times \text{l. komórek dwujądrowych}) + (3 \times \text{l. komórek wielojądrowych}))}{(\text{łączna liczba komórek})}$$

Dlatego CBPI wynoszący 1 (wszystkie komórki są jednojądrowe) odpowiada cytostazie na poziomie 100 %.

Cytostaza = 100-RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{l. komórek dwujądrowych}) + (2 \times \text{l. komórek wielojądrowych}))/(\text{łączna l. komórek})_T}{((\text{l. komórek dwujądrowych}) + (2 \times \text{l. komórek wielojądrowych}))/(\text{łączna l. komórek})_C} \times 100$$

T = hodowle poddane działaniu substancji

C = hodowle kontrolne

Tym samym RI wynoszący 53 % oznacza, że w porównaniu do liczby komórek, które podzieliły się i utworzyły komórki dwu- i wielojądrowe w hodowli kontrolnej, jedynie 53 % tej liczby podzieliło się w hodowli poddanej działaniu substancji, tj. cytostaza na poziomie 47 %.

W przypadku gdy nie stosuje się cytochalazyny B, zaleca się ocenę cytotoksyczności na podstawie **względnego wzrostu liczby komórek (RICC)** lub **względnego podwojenia populacji (RPD)** (69), ponieważ oba te wskaźniki uwzględniają odsetek populacji komórek, które uległy podziałowi.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{wzrost l. komórek whodowlach poddanych działaniu subst.(l. końc. – l. początk.))}}{(\text{wzrost liczby whodowlach kontrolnych(l. końcowa – l. początkowa))}} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{liczba podowjeń populacji whodowlach poddanych działaniu subst.})}{(\text{liczba podowjeń populacji wkontrolnych})} \times 100$$

gdzie:

Podwojenie populacji = [log (liczba komórek po poddaniu działaniu substancji chemicznej ÷ początkowa liczba komórek)] ÷ log 2

Dlatego też RICC lub RPD wynoszący 53 % oznacza cytotoksyczność/cytostazę na poziomie 47 %.

▼M7

W przypadku stosowania **wskaźnika proliferacji (PI)** cytotoksyczność można ocenić przez liczenie klonów składających się z 1 komórki (cl1), 2 komórek (cl2), 3 do 4 komórek (cl4) i 5 do 8 komórek (cl8).

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

PI został wykorzystany jako cenny i wiarygodny parametr cytotoksyczności również w przypadku linii komórkowych hodowanych *in vitro* w nieobecności cytochalazyny B (35) (36) (37) (38) i może być stosowany jako użyteczny dodatkowy parametr.

W każdym razie liczba komórek przed poddaniem działaniu substacji powinna być taka sama zarówno w przypadku hodowli poddanych działaniu substancji chemicznej, jak i w przypadku hodowli na potrzeby kontroli ujemnej.

Chociaż wskaźnik RCC (tj. liczba komórek w hodowlach poddanych działaniu substancji chemicznej podzielona przez liczbę komórek w hodowlach kontrolnych) był w przeszłości wykorzystywany jako parametr cytotoksyczności, nie zaleca się dalszego korzystania z tego wskaźnika, ponieważ może to skutkować niedoszacowaniem cytotoksyczności.

Podczas stosowania automatycznych systemów zliczania, na przykład cytometrii przepływowej, laserowej cytometrii skaningowej lub analizy obrazu, liczbę komórek we wspomnianym wzorze można zastąpić liczbą jąder.

W przypadku hodowli na potrzeby kontroli ujemnej wskaźnik podwojenia populacji lub wskaźnik replikacji powinien być zgodny z wymogiem pobierania próbek komórek po poddaniu działaniu substancji w czasie równoważnym około 1,5–2-krotności standardowego czasu trwania cyklu komórkowego.”;

▼M3

B.50. DZIAŁANIE UCZULAJĄCE NA SKÓRĘ: BADANIE LOKALNYCH WĘZŁÓW CHŁONNYCH DA

WSTĘP

1. Wytyczne OECD w odniesieniu do badania chemikaliów i metody badań UE są okresowo poddawane przeglądowi w związku z postępem naukowym, zmieniającymi się potrzebami regulacyjnymi oraz troską o dobrostan zwierząt. Pierwsza metoda badania (TM) (B.42) przy określaniu działania uczulającego na skórę u myszy – badanie lokalnych węzłów chłonnych (LLNA; wytyczna OECD 429 dotycząca badań) została poddana przeglądowi (1). Szczegóły walidacji LLNA i przegląd powiązanej bibliografii opublikowano w (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). W LLNA radioizotopy tymidyny lub jodyny są stosowane do pomiaru proliferacji limfocytów i w związku z tym badanie ma ograniczone zastosowanie w przypadku, gdy nabycie, zastosowania lub usuwanie promieniotwórczości jest problematyczne. Badanie LLNA: DA (opracowane przez Daicel Chemical Industries, Ltd.) jest niepromieniotwórczym wariantem badania LLNA, dzięki któremu, poprzez wykorzystanie bioluminescencji, udaje się dokonać pomiaru ilościowego zawartości adenozynotrifosforanu (ATP), służącego za wskaźnik proliferacji limfocytów. Badanie LLNA: DA zostało zatwierdzone i poddane przeglądowi oraz zalecone przez międzynarodowy panel ds. wzajemnych przeglądów jako przydatne do rozpoznawania chemikaliów uczulających skórę i jej nieuczulających, z pewnymi zastrzeżeniami (10) (11) (12) (13). Ta TM jest zaprojektowana dla celów oceny potencjału uczulenia skóry przez chemikalia (substancje i mieszaniny) u zwierząt. Rozdział B.6 niniejszego załącznika oraz wytyczna OECD dotycząca badań nr 406 wykorzystują badania na świnkach morskich, w szczególności test maksymalizacji na śwince morskiej oraz test Buehlera (14). Metoda LLNA (rozdział B.42 niniejszego załącznika; wytyczna OECD dotycząca badań nr 429) oraz jej dwa niepromieniotwórcze warianty: LLNA: DA (rozdział B.50 niniejszego załącznika; wytyczna OECD dotycząca badań nr 442 A) oraz LLNA: BrdU-ELISA (rozdział B.51 niniejszego załącznika; wytyczna OECD dotycząca badań nr 442 B) zapewniają bardziej ograniczone i udoskonalone wykorzystanie zwierząt w porównaniu z badaniami na świnkach morskich opisanymi w B.6 i w wytycznej OECD dotyczącej badań nr 406 (14).

2. Podobnie jak metoda LLNA, LLNA: DA bada fazę indukcyjną uczulenia skóry i dostarcza danych ilościowych odpowiednich dla dokonania oceny dawka-reakcja. Ponadto zdolność do wykrywania substancji działających uczulająco na skórę bez konieczności korzystania z izotopowego oznaczania DNA eliminuje możliwość narażenia zawodowego na działanie promieniotwórcze oraz kwestie związane z usuwaniem odpadów. To z kolei może pozwolić na zwiększone wykorzystanie myszy w celu wykrycia substancji działających uczulająco na skórę, co może doprowadzić do dalszego ograniczenia stosowania świnek morskich do badania odporności na działanie uczulające na skórę (tj. B6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (14).

DEFINICJE

3. Definicje są zamieszczone w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

4. LLNA: DA to zmodyfikowana metoda LLNA do wykrywania chemikaliów potencjalnie uczulających skórę, ze szczególnymi ograniczeniami. Nie oznacza to, że należy koniecznie we wszystkich przypadkach stosować LLNA: DA zamiast LLNA lub badań na śwince morskiej (tj. B.6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (14), a tylko, że badanie to ma tę samą wartość merytoryczną i może zostać zastosowane jako badanie alternatywne, którego pozytywne lub negatywne wyniki nie wymagają już dalszego potwierdzenia (10) (11). Laboratorium badawcze powinno

▼M3

uwzględnić wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji przed rozpoczęciem badań. Informacje te powinny obejmować tożsamość i budowę chemiczną badanej substancji; jej właściwości fizyko-chemiczne; wyniki innych badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo* badanej substancji i dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie pokrewnych substancji chemicznych. Należy uwzględnić te informacje przy określaniu, czy metoda LLNA: DA jest odpowiednia do badania danej substancji (z uwagi na niekompatybilność niektórych rodzajów chemikaliów z metodą LLNA DA [zob. pkt 5] oraz przy wyborze dawki.

5. Będąc metodą *in vivo*, LLNA: DA nie eliminuje wykorzystania zwierząt w określaniu alergicznego kontaktowego działania uczulającego. Może ona jednak ograniczyć stosowanie zwierząt do tego celu w porównaniu z badaniami na świnkach morskich (B.6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (14). Co więcej, LLNA oferuje znacznie bardziej wyrafinowany sposób wykorzystywania zwierząt (mniej bólu i cierpienia) do badania alergicznego kontaktowego działania uczulającego, gdyż w odróżnieniu od B.6 i wytycznej OECD dotyczącej badań nr 406 metoda DA nie wymaga wywoływania reakcji nadwrażliwości skóry poprzez prowokację. Pomimo zalet LLNA: DA i jej przewagi nad B.6 i wytyczną OECD dotyczącą badań nr 406 (14), istnieją pewne ograniczenia, które mogą spowodować konieczność wykorzystania B.6 lub wytycznej OECD dotyczącej badań nr 406 (np. badanie niektórych metali, fałszywe wyniki pozytywne w przypadku niektórych środków drażniących skórę [takich jak niektóre substancje powierzchniowo czynne] (6) (1 oraz rozdział B.42 w niniejszym załączniku), rozpuszczalność badanej substancji). Ponadto klasy chemiczne lub substancje zawierające grupy funkcjonalne, co do których wykazano, że działają jako potencjalne czynniki zakłócające (16), mogą wymagać użycia badań na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD dotyczącej badań nr 406 (14)). Zalecono stosowanie ograniczeń wskazanych w LLNA (1 oraz rozdział B.42 w niniejszym załączniku) również w odniesieniu do LLNA: DA (10). Ponadto wykorzystanie LLNA: DA może okazać się nieodpowiednie w przypadku badania substancji, które wpływają na poziom ATP (np. substancji działających jako inhibitory ATP) lub tych, które wpływają na pomiar międzykomórkowego ATP (np. z uwagi na obecność enzymów rozkładających ATP, obecność międzykomórkowego ATP w węźle chłonnym). Oprócz tych zidentyfikowanych przypadków metoda LLNA: DA powinna być odpowiednia do badania wszelkich substancji, chyba że istnieją właściwości związane z tymi substancjami, które mogą wpływać na dokładność badania LLNA: DA. Ponadto należy uwzględnić możliwość otrzymania pozytywnych wyników granicznych gdy wartości wskaźnika stymulacji (SI) kształtują się pomiedzy 1,8 a 2,5 (zob. pkt 31–32). Opiera się to na bazie danych uzyskanej przy zatwierdzaniu 44 substancji z wykorzystaniem SI ≥ 1,8 (zob. pkt 6), gdzie za pomocą LLNA: DA poprawnie zidentyfikowano wszystkie 32 LLNA substancje uczulające, lecz niewłaściwie oznaczono trzy z 12 LLNA substancji nieuczulających o wartościach SI pomiędzy 1,8 i 2,5 (tj. graniczne wartości dodatnie) (10). Jednak w związku z tym, że ten sam zestaw danych był stosowany do ustalania wartości SI i obliczania przewidywalnych właściwości badania, przytoczone wyniki mogą być zawyżonym szacunkiem prawdziwych przewidywalnych właściwości.

ZASADA METODY BADANIA

6. Podstawową zasadą u podłoża LLNA: DA jest fakt, że czynniki uczulające wywołują proliferację limfocytów w węźle chłonnym odprowadzającym limfę z miejsca przyłożenia środka chemicznego. Ta proliferacja jest proporcjonalna do zastosowanej dawki oraz potencjału zastosowanego alergenu i jest prostym środkiem uzyskania ilościowego pomiaru uczulenia. Proliferacja jest mierzona przez porównanie średniej proliferacji w każdej badanej grupie do średniej proliferacji w grupie kontrolnej otrzymującej nośnik (VC). Określa się stosunek średniej proliferacji w każdej grupie poddanej działaniu środka do średniej proliferacji w równoległej grupie VC, który jest nazywany wskaźnikiem stymulacji (SI) i powinien wynosić ≥ 1,8 zanim substancja badana zostanie zaklasyfikowana jako potencjalny czynnik uczulający skórę.

▼M3

Procedury opisane w niniejszym dokumencie są oparte na wykorzystaniu pomiaru zawartości ATP na podstawie bioluminescencji (o której wiadomo, że jest zgodna z liczbą żywych komórek) (17) do wykrycia zwiększonej liczby rozmnażających się wegetatywnie komórek w odprowadzających usznych węzłach chłonnych (18) (19). Metoda z wykorzystaniem bioluminescencji posługuje się enzymem lucyferazy do katalizowania zjawiska powstawania światła z ATP i lucyferyny zgodnie z następującą reakcją:

$$ATP + Luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + Light$$

Natężenie emitowanego światła jest liniowo powiązane ze stężeniem ATP i mierzy się je za pomocą luminometra. Badanie z wykorzystaniem lucyferyny-lucyferazy jest czułą metodą ilościowego pomiaru ATP wykorzystywaną w szerokim wachlarzu zastosowań (20).

OPIS BADANIA

Dobór gatunków zwierząt

7. Mysz jest gatunkiem preferowanym do tego badania. Badania walidacyjne dla LLNA: DA były przeprowadzane wyłącznie na szczepie CBA/J, który z tego względu uznaje się za szczep preferowany (12) (13). Wykorzystuje się młode dorosłe samice myszy, które są nieródkami i nie są w ciąży. Na początku doświadczenia samice powinny mieć 8–12 tygodni, a zróżnicowanie mas ciała poszczególnych zwierząt powinno być minimalne i nie przekraczać 20 % średniej masy ciała. Można ewentualnie wykorzystać inne szczepy i samce, jeżeli dysponuje się danymi świadczącymi o tym, że nie istnieją znaczące różnice w reakcji na LLNA: DA w zależności od szczepu i/lub płci.

Warunki w pomieszczeniach dla zwierząt i pożywienie

8. Myszy powinny być trzymane w grupach (21), chyba że istnieją odpowiednie naukowe przesłanki dla trzymania myszy pojedynczo. Temperatura w badawczych pomieszczeniach hodowlanych powinna wynosić 22 ± 3 °C. Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej.

Przygotowanie zwierząt

9. Zwierzęta wybierane są losowo i znakowane w sposób umożliwiający indywidualną identyfikację (ale nie przez jakiekolwiek znaki na uszach) i trzymane w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem dawkowania w celu umożliwienia zaaklimatyzowania do warunków laboratoryjnych. Przed rozpoczęciem podawania bada się wszystkie zwierzęta w celu upewnienia się, że nie mają żadnych zauważalnych zmian skórnych.

Przygotowanie roztworów dozujących

10. Stałe substancje powinny zostać rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczone, jeżeli jest to odpowiednie, przed zastosowaniem na uchu myszy. Chemikalia płynne można zastosować czyste lub rozcieńczone przed dawkowaniem. Chemikalia nierozpuszczalne, takie jak te najczęściej spotykane w wyrobach medycznych, należy poddać ekstrakcji w wyjątkowych warunkach w odpowiednim rozpuszczalniku w celu wykrycia wszystkich możliwych do wyekstrahowania składników do badania przed zastosowaniem na uchu myszy. Substancje badane należy przygotowywać codziennie, chyba że dane dotyczące stabilności wykazują dopuszczalność składowania.

▼M3

Sprawdzenie wiarygodności

11. Pozytywne substancje kontrolne (PC) wykorzystuje się do wykazania właściwego działania badania poprzez ich reakcję z odpowiednią i powtarzalną czułością na badaną substancję uczulającą, dla której wielkość reakcji jest dobrze scharakteryzowana. Włączanie równoległej PC jest zalecane, ponieważ potwierdza się w ten sposób kompetencje laboratorium do skutecznego przeprowadzenia każdego badania i umożliwia dokonanie oceny odtwarzalności i porównywalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej. Niektóre organy regulacyjne mogą wymagać także PC dla każdego badania i w związku z tym zachęca się użytkowników do konsultacji z właściwymi organami przed rozpoczęciem LLNA: DA. Odpowiednio zaleca się rutynowe wykorzystywanie równoległej PC, aby uniknąć potrzeby dodatkowych badań na zwierzętach do spełnienia tych wymagań, które mogą powstać w związku ze stosowaniem okresowej PC (zob. pkt 12). PC powinna dać w teście LLNA: DA reakcję pozytywną na poziomie narażania, przy którym oczekuje się wzrostu wskaźnika stymulacji (SI) ≥ 1,8 większego niż w grupie kontroli negatywnej (NC). Dawkę PC należy dobrać w taki sposób, by nie powodować nadmiernego podrażnienia skóry lub ogólnoustrojowej toksyczności, a indukcja była powtarzalna, ale nie nadmierna (tj. SI > 10 byłyby uznane za zbyt wysokie). Preferowane PC to 25 % aldehyd cynamonowy heksylu (Chemical Abstracts Service [CAS] nr 101-86-0) i 25 % eugenol (numer CAS 97-53-0) w acetonie: oliwa z oliwek (w proporcji objętościowej 4:1 v/v). Mogą zaistnieć okoliczności, w których można użyć innych PC spełniających powyższe kryteria, pod warunkiem że istnieje po temu odpowiednie uzasadnienie.

12. Pomimo że zaleca się włączenie równoległej grupy PC, mogą zaistnieć sytuacje, w których okresowe badanie PC (tj. w odstępach nie dłuższych niż 6 miesięcy) może okazać się wystarczające w przypadku laboratoriów, które regularnie przeprowadzają badanie LLNA: DA (tj. przeprowadzają badanie LLNA: DA co najmniej raz na miesiąc) i dysponują wcześniejszymi danymi z pozytywnych kontroli, świadczącymi o tym, że laboratorium jest w stanie uzyskiwać odtwarzalne i dokładne wyniki w pozytywnych kontrolach. Można wykazać odpowiedni poziom biegłości w wykonywaniu badania LLNA: DA, uzyskując stałe pozytywne wyniki PC w co najmniej 10 niezależnych badaniach przeprowadzonych w rozsądnym terminie (tj. w okresie krótszym niż rok).

13. Należy zawsze włączać równoległą grupę PC, jeśli zachodzi proceduralna zmiana w LLNA: DA (np. zmiana przeszkolonego personelu, zmiany w metodzie badania materiałów i/lub odczynników, zmiany w metodzie badania urządzenia, zmiana źródła badanych zwierząt), a przedmiotowe zmiany powinny być udokumentowane w laboratoryjnych sprawozdaniach. Należy zwrócić uwagę na wpływ tych zmian na odpowiedniość ustalonych wcześniej danych przy określaniu konieczności zgromadzenia nowej bazy danych, aby udokumentować spójność wyników PC.

14. Badacze powinni być świadomi, że decyzja o przeprowadzeniu badania PC na zasadzie okresowej zamiast równolegle wywiera wpływ na odpowiedniość i akceptowalność negatywnych wyników badań uzyskanych bez równoległej PC w okresie pomiędzy każdym okresowym badaniem PC. Na przykład, jeżeli w okresowych PC uzyskany zostaje wynik fałszywie negatywny, negatywne wyniki substancji badanej uzyskane w okresie między ostatnim dopuszczalnym okresowym badaniem PC i niedopuszczalnym okresowym badaniem PC mogą być kwestionowane. Należy dokładnie rozważyć tego rodzaju skutki przy podejmowaniu decyzji, czy należy włączyć równoległą PC, czy tylko przeprowadzać PC na zasadzie okresowej. Należy również wziąć pod uwagę możliwość wykorzystania mniejszej liczby zwierząt w ramach grupy równoległej PC, jeżeli jest to naukowo uzasadnione oraz jeżeli laboratorium może wykazać, w oparciu o wcześniej zgromadzone dane, że można wykorzystać mniejszą liczbę myszy (22).

▼M3

15. Chociaż substancja kontroli pozytywnej powinna być testowana w nośniku, o którym wiadomo, że wywołuje konsekwentną reakcję (np. aceton: oliwa z oliwek; w proporcji objętościowej 4:1, v/v), mogą jednak zaistnieć pewne sytuacje wynikające z przepisów, w których przetestowanie w niestandardowym nośniku (o formulacji odpowiedniej klinicznie/chemicznie) może być również konieczne (23). Jeżeli równoległa PC jest badana w innym nośniku niż substancja badana, wówczas należy włączyć oddzielną VC w odniesieniu do równoległej PC.

16. W przypadkach, gdy ocenia się substancje badane konkretnej klasy chemicznej lub zakres reakcji, substancje wzorcowe mogą być użyteczne, także aby wykazać, że metoda badawcza jest odpowiednia dla wykrywania potencjalnego działania uczulającego na skórę przez tego rodzaju substancje. Odpowiednie substancje wzorcowe powinny posiadać następujące właściwości:

— strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do klasy badanej substancji,

— znane właściwości fizyczne i chemiczne,

— dane potwierdzające z LLNA: DA,

— dane potwierdzające z innych modeli zwierzęcych i/lub ludzkich.

PROCEDURA BADANIA

Liczba zwierząt i poziomy dawek

17. W każdej grupie badanej powinny być wykorzystane nie mniej niż cztery zwierzęta, z minimalną liczbą trzech stężeń substancji badanej oraz równoległą grupą NC otrzymującą jedynie nośnik substancji badanej i grupą kontrolną PC (równoległą lub najnowszą, na podstawie polityki laboratoryjnej, biorąc pod uwagę pkt 11–15). Należy rozważyć zbadanie wielu dawek PC, szczególnie gdy badanie PC jest prowadzone na zasadzie nieregularnej. Z wyjątkiem zastosowania substancji badanej, ze zwierzętami grup kontrolnych należy się obchodzić w sposób identyczny jak ze zwierzętami grup badanych.

18. Dobór dawek i wybór nośnika powinien być oparty na zaleceniach podanych w pozycjach (2) i (24) bibliografii. Kolejne dawki zazwyczaj wybiera się z odpowiedniego szeregu stężeń takich, jak 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % itd. Do wyboru szeregu stężeń należy dołączyć odpowiednie naukowe uzasadnienie. O ile są dostępne, należy uwzględnić wszystkie istniejące informacje toksykologiczne (np. o ostrej toksyczności i o podrażnieniu skóry) oraz o strukturalnych i fizykochemicznych właściwościach badanej substancji (i/lub substancji zbliżonych pod względem budowy) przy wyborze trzech kolejnych stężeń, tak aby najwyższe stężenie maksymalizowało narażenie, nie doprowadzając jednak do ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry (24) (25). W przypadku braku takich informacji może okazać się konieczne przeprowadzenie badania wstępnego (zob. pkt 21–24)

19. Nośnik nie powinien zakłócać wyniku badania lub wpływać na niego oraz powinien być wybrany na podstawie maksymalizowania rozpuszczalności w celu uzyskania najwyższego osiągalnego stężenia, dając jednocześnie możliwość uzyskania roztworu/zawiesiny nadającej się do podania substancji badanej. Zalecanymi nośnikami są aceton: oliwa z oliwek (w proporcji objętościowej 4:1 v/v), N,N-dimetyloformamid, metylo etylo keton, glikol propylenowy i sulfotlenek dimetylowy (6), ale mogą być użyte inne, jeśli przedstawi się wystarczające uzasadnienie naukowe. W niektórych sytuacjach może okazać się konieczne użycie, jako dodatkowej kontroli, rozpuszczalnika odpowiedniego ze względów klinicznych, lub postaci handlowej, w której badana substancja wprowadzana jest na rynek. Szczególną uwagę należy zwrócić na zapewnienie, aby substancje hydrofilne zostały włączone do systemu nośnika, który nawilża skórę i nie spływa z niej natychmiast, przez włączenie odpowiednich środków zwiększających rozpuszczalność (np. 1 % Pluronic ® L92). A zatem należy unikać roztworów całkowicie wodnych.

▼M3

20. Przetwarzanie węzłów chłonnych z poszczególnych myszy umożliwia ocenę zmienności pomiędzy zwierzętami oraz statystyczne porównanie różnicy między substancją badaną i pomiarami grupy VC (zob. pkt 33). Ponadto dokonanie oceny możliwości obniżenia liczby myszy w grupie PC jest wykonalne jedynie wówczas, gdy gromadzone są dane dotyczące poszczególnych zwierząt (22). Co więcej, niektóre organy regulacyjne wymagają zbierania danych dotyczących poszczególnych zwierząt. Regularne gromadzenie danych dotyczących poszczególnych zwierząt stanowi o dobrostanie zwierząt dzięki temu, że unika się powielania badań, do którego dochodziłoby w przypadku, gdyby wyniki dotyczące substancji badanej pierwotnie zebrane w jeden sposób (np. poprzez połączenie danych dotyczących zwierząt) miały zostać rozpatrzone w późniejszym terminie przez organy regulacyjne zgodnie z innymi wymogami (np. w ramach danych dotyczących poszczególnych zwierząt).

Badanie wstępne

21. W przypadku braku informacji pozwalającej określić najwyższą dawkę, jaka ma zostać zbadana (zob. pkt 18), należy przeprowadzić badanie wstępne w celu określenia właściwego poziomu dawki do badania w metodzie LLNA: DA. Celem badania wstępnego jest opracowanie wytycznych dotyczących wyboru maksymalnej dawki, jaką należy stosować w głównym badaniu LLNA: DA, w przypadku gdy nie dysponuje się informacjami na temat stężenia powodującego toksyczność ogólnoustrojową (zob. pkt 24) i/lub nadmierne miejscowe podrażnienie skóry (zob. pkt 23). Maksymalny poziom badanej dawki powinien wynosić 100 % substancji badanej w przypadku cieczy lub maksymalne możliwe stężenie w przypadku ciał stałych lub zawiesin.

22. Badanie wstępne przeprowadza się w warunkach identycznych do tych, w jakich przeprowadza się główne badanie LLNA: DA, z tym że nie przeprowadza się oceny proliferacji węzła chłonnego oraz można wykorzystać mniejszą liczbę zwierząt w grupie badanej. Zaleca się jedno lub dwa zwierzęta w grupie badanej. Wszystkie myszy będą obserwowane codziennie pod kątem jakichkolwiek klinicznych oznak toksyczności ogólnoustrojowej lub miejscowego podrażnienia skóry w miejscu zastosowania. Masy ciała są rejestrowane przed badaniem i przed jego zakończeniem (dzień 8.). Obydwoje uszu każdej myszy bada się pod kątem wystąpienia rumienia i ocenia przy wykorzystaniu tabeli 1 (25). Pomiary grubości ucha są przeprowadzane przy wykorzystaniu grubościomierza (np. cyfrowych mikrometrów lub grubościomierza Peacock Dial) w dniu 1. (przed podaniem substancji), w dniu 3. (około 48 godzin następujących po podaniu pierwszej dawki) oraz w dniu 7. (24 godziny przed zakończeniem badania) i dniu 8. Ponadto w dniu 8. grubość ucha można określić za pomocą kolczykownicy do pomiaru masy, co powinno być przeprowadzone po uśmierceniu zwierząt w humanitarny sposób. Nadmierne miejscowe podrażnienie skóry jest sygnalizowane przez rumień o wyniku ≥ 3 i/lub zwiększenie grubości ucha o ≥ 25 % w dniu pomiaru (26) (27). Najwyższa dawka wybrana do głównego badania LLNA: DA to następna niższa dawka w szeregu stężeń badania wstępnego (zob. pkt 18), która nie wywołuje ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry.

Tabela 1

Ocena punktowa rumienia

Objawy	Wynik
Brak rumienia	0
Bardzo lekki rumień (prawie niewidoczny)	1
Wyraźny rumień	2

▼M3

Objawy	Wynik
Rumień umiarkowany do mocnego	3
Mocny rumień (czerwień przypominająca barwę mięsa czerwonego) do form obrzęku wykluczających klasyfikację rumienia	4

23. Oprócz 25 % zwiększenia grubości ucha 26) (27), do zidentyfikowania substancji drażniących w metodzie LLNA wykorzystywano też statystycznie istotne zwiększenie grubości ucha u myszy badanych w porównaniu z myszami kontrolnymi (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). O ile jednak statystycznie znaczące zwiększenie może wystąpić przy grubości ucha mniejszej niż 25 %, to nie udało się go powiązać z nadmiernym podrażnieniem (30) (31) (32) (33) (34).

24. Następujące obserwacje kliniczne mogą wskazywać na toksyczność ogólnoustrojową (35), jeśli są wykorzystywane jako część zintegrowanej oceny i w związku z tym mogą określać maksymalne dawki do stosowania w LLNA: DA: zmiany w funkcjach układu nerwowego (np. piloerekcja, ataksja, drżenia, oraz konwulsje); zmiany w zachowaniu (na przykład agresja, zmiany w czyszczeniu, wyraźna zmiana w poziomie aktywności); zmiany w sposobie oddychania (np. zmiany w częstotliwości i intensywności oddychania, takie jak duszność, dyszenie oraz rzężenie), a także zmiany w konsumpcji żywności i wody. Ponadto w ocenie należy wziąć pod uwagę oznaki stanów zwiększonej senności i/lub brak reakcji oraz wszelkie objawy kliniczne sygnalizujące coś więcej niż chwilowy ból i cierpienie, lub > 5 % spadek masy ciała od dnia 1. do dnia 8. czy śmiertelność. Zwierzęta konające oraz zwierzęta wykazujące objawy silnego bólu i zagrożenia należy humanitarnie uśmiercić (36).

Harmonogram doświadczalny głównego badania

25. Harmonogram doświadczalny badania jest następujący:

— *Dzień 1:* Indywidualnie określić i odnotować wagę każdego zwierzęcia oraz wszelkie obserwacje kliniczne. Nałożyć 1 % roztworu wodnego dodecylo siarczanu sodu (SLS) na część grzbietową każdego ucha przy użyciu pędzla zanurzonego w roztworze SLS, tak aby cała grzbietowa część każdego ucha została pokryta za pomocą czterech do pięciu pociągnięć pędzla. Po godzinie od momentu podania SLS nakłada się 25 µl właściwego roztworu substancji badanej lub samego nośnika lub kontroli pozytywnej (równoległej lub najnowszej, na podstawie polityki laboratoryjnej, biorąc pod uwagę pkt 11–15), na część grzbietową każdego ucha.

— *Dni 2, 3 i 7:* Powtórzyć przeprowadzoną w dniu 1. procedurę wstępnego poddania działaniu 1 % wodnego roztworu SLS i nałożenia substancji badanej.

— *Dni 4, 5 i 6:* Bez podawania.

— *Dzień 8:* Zanotować wagę każdego zwierzęcia oraz wszelkie obserwacje kliniczne. Około 24 do 30 godzin po rozpoczęciu stosowania w dniu 7. należy uśmiercić zwierzęta w sposób humanitarny. Wyciąć uszne węzły chłonne z każdego ucha myszy i przetwarzać oddzielnie w roztworze chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) dla każdego zwierzęcia. Informacje i schematy identyfikacji i rozbioru węzła chłonnego można znaleźć w pozycji (22). Do celów dalszego monitorowania miejscowych reakcji skóry w badaniu głównym, w protokole badania można uwzględnić dodatkowe parametry, takie jak punktacja rumienia ucha lub pomiar grubości ucha (zrobiony za pomocą grubościomierza lub za pomocą kolczykownicy do pomiaru masy w czasie sekcji).

▼M3

Przygotowanie zawiesiny komórek

26. Przygotowuje się jednokomórkową zawiesinę z komórek węzła chłonnego (LNC) usuniętych obustronnie dla każdego zwierzęcia, przez umieszczenie węzłów chłonnych pomiędzy dwoma szkiełkami mikroskopowymi i zastosowanie lekkiego nacisku w celu rozdrobnienia węzłów. Po upewnieniu się, że tkanki zostały rozprowadzone cienką warstwą, należy rozdzielić oba szkiełka. Zawiesić tkanki z obu szkiełek w PBS, trzymając każde szkiełko pod kątem nad szalką Petriego i płucząc przy użyciu PBS i jednocześnie zeskrobując tkankę ze szkiełka skrobakiem do komórek. Ponadto węzły chłonne u zwierząt z grupy kontroli negatywnej są niewielkie, tak więc ostrożne działanie ma istotne znaczenie dla uniknięcia sztucznego wpływu na wartości SI. Do płukania szkiełek należy wykorzystać całkowitą objętość 1 mL PBS. Zawiesinę LNC w szalce Petriego należy homogenizować lekko za pomocą skrobaka do komórek. 20 µL alikwoty zawiesiny LNC zbiera się następnie za pomocą mikropipety, przy czym należy uważać aby nie zebrać widocznej dla oka membrany, a następnie miesza się z 1,98 mL PBS, tak aby otrzymać 2 mL próbki. Następnie przygotowuje się drugą 2 mL próbkę zgodnie z tą samą procedurą, tak aby przygotowane zostały dwie próbki dla każdego zwierzęcia.

Określenie proliferacji komórkowych (pomiar zawartości ATP limfocytów)

27. Wzrost zawartości ATP w węzłach chłonnych jest mierzony za pomocą metody lucyferyny-lucyferazy z zastosowaniem zestawu do pomiaru ATP, który mierzy bioluminescencję w umownych jednostkach luminescencyjnych (RLU). Czas badania od momentu uśmiercenia zwierząt do pomiaru zawartości ATP dla każdego osobnika powinien być jednolity, w ciągu około 30 minut, ponieważ uważa się, że zawartość ATP stopniowo maleje wraz z upływem czasu od momentu uśmiercenia zwierząt (12). Zatem serię procedur, poczynając od usunięcia usznych węzłów chłonnych aż do pomiaru ATP, należy zakończyć w ciągu 20 minut zgodnie z wcześniej ustalonym harmonogramem, takim samym dla każdego zwierzęcia. Pomiar luminescencji ATP należy przeprowadzić w każdej 2 mL próbce w taki sposób, aby w odniesieniu do każdego osobnika przeprowadzano łącznie dwa pomiary ATP. Ustala się wówczas średnią wartość luminescencji ATP i wykorzystuje ją w późniejszych obliczeniach (zob. pkt 30).

OBSERWACJE

Obserwacje kliniczne

28. Zwierzęta poddaje się starannej obserwacji klinicznej raz dziennie pod kątem jakichkolwiek oznak klinicznych, czy to miejscowego podrażnienia w miejscu zastosowania, czy też ogólnoustrojowej toksyczności. Wszystkie obserwacje kliniczne są systematycznie odnotowywane w postaci zapisów prowadzonych dla każdej myszy. Plany monitorowania powinny obejmować kryteria umożliwiające szybką identyfikację tych myszy, które wykazują oznaki toksyczności ogólnoustrojowej, nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry lub żrącego działania na skórę, w celu eutanazji (36).

Masy ciała

29. Jak wskazano w pkt 25, indywidualne masy ciała określane są na początku badania i przy planowanym humanitarnym uśmierceniu zwierząt.

OBLICZANIE WYNIKÓW

30. Wyniki dla każdej grupy badanej są wyrażane jako średni SI. SI otrzymuje się przez podzielenie średniej wartości RLU/mysz w obrębie każdej grupy dawkowania substancji badanej oraz grupy PC przez średnią RLU/mysz obliczoną dla grupy rozpuszczalnika/VC. Średnie SI dla grup VC wynosi zatem jeden.

▼M3

31. Proces decyzyjny uznaje wynik za pozytywny, gdy SI ≥ 1,8 (10). Jednakże siła reakcji na dawkę, znaczenie statystyczne i spójność reakcji rozpuszczalnik/nośnik i PC mogą również być stosowane przy ustalaniu, czy wynik graniczny (tj. wartość SI pomiędzy 1,8 a 2,5) można uznać za pozytywny (2) (3) (37).

32. W przypadku granicznego wyniku pozytywnego o wartości SI pomiędzy 1,8 i 2,5 użytkownicy mogą rozważyć dodatkowe informacje, takie jak relacja dawka-reakcja, oznaki toksyczności ogólnoustrojowej lub nadmiernego podrażnienia oraz, w stosownych przypadkach, istotność statystyczna wraz z wartościami SI w celu potwierdzenia, czy wyniki te są pozytywne (10). Należy również rozważyć różne własności substancji badanej, w tym rozważyć, czy jest ona strukturalnie pokrewna znanym czynnikom uczulającym, czy powoduje nadmierne podrażnienie skóry u myszy, oraz zaobserwowany charakter relacji dawka-reakcja. Te i inne względy omówione są szczegółowo gdzie indziej (4).

33. Gromadzenie danych dotyczących poszczególnych myszy umożliwi analizę statystyczną danych w odniesieniu do obecności i relacji dawka-reakcja. Ocena statystyczna może obejmować ocenę relacji między dawką a reakcją, jak również odpowiednio dostosowane porównania badanych grup (np. grupę badaną w parach w porównaniu z równoległą grupą kontrolną otrzymującą nośnik/rozpuszczalnik). Analizy statystyczne mogą obejmować np. regresję liniową lub badanie Williamsa w celu dokonania oceny tendencji w relacji między dawką a reakcją oraz badanie Dunnetta w odniesieniu do porównań par. Przy wyborze właściwej metody analizy statystycznej danych prowadzący badanie powinien zachować świadomość możliwej nierówności wariancji lub innych powiązanych problemów, które mogą spowodować konieczność transformacji danych lub przeprowadzenia nieparametrycznej analizy statystycznej. W każdym przypadku prowadzący badanie musi liczyć się z koniecznością przeprowadzenia obliczeń SI i analiz statystycznych z wykorzystaniem pewnych punktów danych i bez nich (tzw. „wartości odstające”).

DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Dane

34. Dane powinny być podsumowane w formie tabelarycznej pokazującej wartości RLU odnoszące się do poszczególnych zwierząt, średnie wartości RLU/zwierzę w danej grupie, związana wartość błędu (np. SD, SEM), oraz średnie SI dla każdej grupy badanej porównywane z równoległą grupą kontrolną z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika.

Sprawozdanie z badań

35. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badane i kontrolne substancje chemiczne:

— numery identyfikujące (np. CAS lub WE, jeśli są dostępne); źródło: czystość; znane zanieczyszczenia; numer partii),

— cechy fizyczne i własności fizykochemiczne (np. lotność, stabilność, rozpuszczalność),

— jeżeli jest to mieszanina, skład i względne udziały procentowe składników.

Rozpuszczalnik/nośnik:

— dane identyfikacyjne (czystość; stężenie, tam gdzie stosowne; wykorzystane objętości),

— uzasadnienie wyboru nośnika.

▼**M3**

Zwierzęta badane:

— źródło, z którego pochodzą myszy szczepu CBA,

— status mikrobiologiczny zwierząt, jeśli jest znany,

— liczba i wiek zwierząt,

— źródło pochodzenia zwierząt, warunki środowiska, pokarm itp.

Warunki badania:

— źródło, numer partii i dane producenta dotyczące zapewniania/kontroli jakości dla zestawu ATP,

— szczegóły przygotowania i stosowania substancji badanej,

— uzasadnienie doboru dawek (łącznie z wynikami z badania wstępnego, jeśli było przeprowadzane),

— nośnik i użyte stężenia substancji testowej oraz całkowita ilość zastosowanej substancji badanej,

— szczegóły dotyczące jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety, źródło wody),

— szczegóły dotyczące poddania działaniu substancji oraz harmonogramów pobierania próbek,

— metody pomiaru toksyczności,

— kryteria uznawania badań za pozytywne lub negatywne,

— szczegóły dotyczące protokołu odchyleń i wyjaśnienie, w jaki sposób odchylenie ma wpływ na planowanie badań i ich wyniki.

Sprawdzenie wiarygodności:

— podsumowanie wyników ostatniego sprawdzenia wiarygodności badań, w tym informacji o wykorzystanej substancji badanej, stężeniach i nośniku,

— dane dotyczące równoległej lub wcześniejszej kontroli pozytywnej i dotyczące równoległej negatywnej (rozpuszczalnik/nośnik) kontroli z laboratorium testującego,

— jeżeli nie włączono równoległej grupy PC, data i sprawozdanie laboratoryjne z ostatniego okresowego PC i sprawozdanie wyszczególniające wcześniejsze dane dotyczące PC dla danego laboratorium, uzasadniające przyczyny dla których nie przeprowadzono PC równolegle.

Wyniki:

— masa poszczególnych myszy na początku dawkowania i przy planowanym uśmierceniu; jak również średnia i opis powiązanego błędu (np. SD, SEM) w odniesieniu do każdej grupy badanej,

— przebieg czasowy pojawienia się i oznaki toksyczności, w tym podrażnień skóry w miejscu podania, jeśli takie wystąpiły, u każdego zwierzęcia,

— godzina uśmiercenia i godzina pomiaru ATP dla każdego zwierzęcia,

— tabela wartości RLU dla poszczególnych myszy i wartości SI dla każdej grupy badanej,

— średni oraz powiązany okres błędu (np. SD, SEM) dla RLU/mysz dla każdej grupy badanej i wyniki analizy obserwacji nietypowych dla każdej grupy badanej,

▼M3

— obliczone SI i właściwe pomiary zmienności, uwzględniające zmienność pomiędzy zwierzętami w odniesieniu do grup substancji badanej i grup kontrolnych,

— relacja dawka-reakcja,

— analizy statystyczne, tam gdzie stosowne.

Omówienie wyników:

— krótki komentarz do wyników, analiza zależności reakcji od dawki oraz w stosownych przypadkach, analizy statystyczne, z wnioskiem, czy substancja testowa powinna być uznana za czynnik uczulający skórę.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paryż. Dostępny na stronie: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Dostępny na stronie: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostępny na stronie: [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. Dostępny na stronie: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1–10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11–26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paryż. Dostępny na stronie: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896–1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90–96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81–88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127–132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27–34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346–370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Dostępny na stronie: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71–89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13–31.

(25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paryż. Dostępny na stronie: [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, 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. Dostępny na stronie: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023–1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostępny na stronie: [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, Paryż. Dostępny na stronie: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paryż. Dostępny na stronie: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: bliskość zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badania (38).

Substancja wzorcowa: uczulająca lub nieuczulajaca substancja wykorzystywana jako norma dla celów porównania z substancją badaną. Substancja wzorcowa powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji; (iii) znane właściwości fizykochemiczne; (iv) dane potwierdzające występowanie znanych skutków; oraz (v) znany potencjał w zakresie pożądanych reakcji.

Fałszywy wynik negatywny: substancja, która w wyniku zastosowania metody badania została oznaczona niewłaściwie jako negatywna lub nieaktywna, podczas gdy w rzeczywistości jest pozytywna lub aktywna.

Fałszywy wynik pozytywny: substancja, która w wyniku zastosowania metody badania została oznaczona niewłaściwie jako pozytywna lub aktywna, podczas gdy w rzeczywistości jest negatywna lub nieaktywna.

Zagrożenie: możliwość wywierania negatywnego wpływu na zdrowie lub środowisko. Niekorzystny wpływ przejawia się tylko wtedy, gdy istnieje wystarczające narażenie.

Odtwarzalność międzylaboratoryjna: miernik zakresu, w jakim różne wykwalifikowane laboratoria, przy użyciu tego samego protokołu i testując tę samą badaną substancję, mogą przynieść jakościowo i ilościowo podobne wyniki. Odtwarzalność międzylaboratoryjna jest określana w procesach poprzedzających walidację i obejmujących walidację i wskazuje, w jakim stopniu badanie można z powodzeniem przekazywać między laboratoriami: nazywana jest również odtwarzalnością międzylaboratoryjną (38).

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna: ustalenie stopnia, w jakim wykwalifikowani pracownicy w tym samym laboratorium mogą z powodzeniem odtworzyć wyniki, stosując szczegółowy protokół w różnych momentach. Nazywana również odtwarzalnością laboratoryjną (38).

Wynik oddstający: wynik odstający jest obserwacją, która znacznie różni się od innych wartości w losowej próbce z populacji.

Zapewnienie jakości: proces zarządzania, w którym przestrzeganie norm i wymogów w zakresie badań laboratoryjnych, oraz procedur dotyczących dokumentacji i dokładności przekazywania danych, jest oceniane przez osoby niezależne od tych, które przeprowadzają badania.

Wiarygodność: miernik zakresu, w jakim metoda badania może zostać wykonana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami w dłuższym okresie czasu, w przypadku jej wykonywania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej (38).

Działanie uczulające na skórę: proces immunologiczny, do którego dochodzi w przypadku, gdy osobnik wrażliwy jest narażony miejscowo na wywołujący uczulenie chemiczny alergen, powodujący immunologiczną reakcję skórną, co może prowadzić do uczulania przez kontakt ze skórą.

Wskaźnik stymulacji (SI): wartość obliczona dla oceny potencjalnego działania uczulającego na skórę przez substancję badaną, który wyraża się stosunkiem proliferacji w grupach poddanych działaniu środka do proliferacji w równoległej grupie kontrolnej nośnika.

Substancja badana (określana także jako badana substancja chemiczna): każda substancja lub mieszanina, badana za pomocą niniejszej TM.

▼M3

B.51. DZIAŁANIE UCZULAJĄCE NA SKÓRĘ: BADANIE LOKALNYCH WĘZŁÓW CHŁONNYCH BRDU-ELISA

WSTĘP

1. Wytyczne OECD w odniesieniu do badania chemikaliów i metody badań UE są okresowo poddawane przeglądowi w związku z postępem naukowym, zmieniającymi się potrzebami regulacyjnymi, oraz troską o dobrostan zwierząt. Pierwsza metoda badania (TM) (B.42) przy określaniu działania uczulającego na skórę u myszy – badanie lokalnych węzłów chłonnych (LLNA; wytyczna OECD dotycząca badań nr 429) została poddana przeglądowi (1 i rozdział B.42 niniejszego załącznika). Szczegóły walidacji LLNA i przegląd powiązanej bibliografii opublikowano w (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). W LLNA radioizotopy tymidyny lub jodyny są stosowane do pomiaru proliferacji limfocytów i w związku z tym badanie ma ograniczone zastosowanie w przypadku, gdy nabycie, zastosowania lub usuwanie promieniotwórczości jest problematyczne. Badanie LLNA BrdU-ELISA [test immunoabsorpcji enzymozależnej] jest niepromieniotwórczą modyfikacją metody LLNA TM, która wykorzystuje nieoznakowaną izotopem promieniotwórczym 5-bromo-2-dezoksyurydynę (BrdU) (Chemical Abstracts Service [nr CAS 59-14-3) w formie systemu badawczego opartego na ELISA, do pomiaru proliferacji limfocytów. Badanie LLNA BrdU-ELISA zostało zatwierdzone i poddane przeglądowi oraz zalecone przez międzynarodowy panel ds. wzajemnych przeglądów jako przydatne do rozpoznawania chemikaliów uczulających skórę oraz jej nieuczulających wraz z pewnymi ograniczeniami (10) (11) (12). Ta TM jest zaprojektowana dla celów oceny potencjału uczulenia skóry przez chemikalia (substancje i mieszaniny) u zwierząt. Rozdział B.6 niniejszego załącznika oraz wytyczna OECD dotycząca badań nr 406 wykorzystują badania na świnkach morskich, w szczególności test maksymalizacji na śwince morskiej oraz test Buehlera (13). Metoda LLNA (rozdział B.42 niniejszego załącznika; wytyczna OECD dotycząca badań nr 429) oraz jej dwa niepromieniotwórcze warianty: LLNA: BrdU-ELISA (rozdział B.51 niniejszego załącznika; wytyczna OECD dotycząca badań nr 442 B) oraz LLNA: DA (rozdział B.50 niniejszego załącznika; wytyczna OECD dotycząca badań nr 442 A) zapewniają bardziej ograniczone i udoskonalone wykorzystanie zwierząt w porównaniu do badań na świnkach morskich opisanych w B.6 i w wytycznej OECD dotyczącej badań nr 406 (13).

2. Podobnie jak LLNA, metoda LLNA: BrdU-ELISA bada fazę indukcyjną uczulenia skóry i dostarcza danych ilościowych odpowiednich dla dokonania oceny dawka-reakcja. Ponadto zdolność do wykrywania substancji działających uczulająco na skórę bez konieczności korzystania z izotopowego oznaczania DNA eliminuje możliwość narażenia zawodowego na działanie promieniotwórcze oraz kwestie związane z usuwaniem odpadów. To z kolei może pozwolić na zwiększone wykorzystanie myszy w celu wykrycia substancji działających uczulająco na skórę, co może doprowadzić do dalszego ograniczenia stosowania świnek morskich do badania odporności na działanie uczulające na skórę (tj. B6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (13).

DEFINICJE

3. Definicje są zamieszczone w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

4. Badanie LLNA BrdU-ELISA to zmieniona metoda LLNA umożliwiająca identyfikację potencjalnych chemikaliów uczulających skórę, z uwzględnieniem szczególnych ograniczeń. Nie oznacza to, że we wszystkich przypadkach należy stosować LLNA: BrdU-ELISA zamiast LLNA lub badań na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (13), a tylko, że badanie to ma tę samą wartość merytoryczną i może zostać zastosowane jako badanie alternatywne, którego pozytywne lub negatywne wyniki nie wymagają już dalszego potwierdzenia (10) (11). Laboratorium badawcze powinno uwzględnić wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji przed rozpoczęciem badań. Informacje te powinny obejmować tożsamość i budowę chemiczną badanej substancji; jej właściwości

▼M3

fizyko-chemiczne; wyniki innych badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo* badanej substancji i dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie pokrewnych substancji chemicznych. Informacje te należy uwzględnić w celu ustalenia, czy LLNA: BrdU-ELISA jest odpowiednia do badania danej substancji (z uwagi na niekompatybilność niektórych rodzajów chemikaliów z metodą LLNA: BrdU-ELISA [zob. pkt 5]) oraz przy wyborze dawki.

5. Badanie LLNA: BrdU-ELISA, będąc metodą *in vivo*, nie eliminuje wykorzystania zwierząt w określaniu alergicznego kontaktowego działania uczulającego. Może ona jednak ograniczyć stosowanie zwierząt do tego celu, w porównaniu z badaniami na świnkach morskich (B.6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (13). Co więcej, LLNA: BrdU-ELISA oferuje znacznie bardziej wyrafinowany sposób wykorzystywania zwierząt do badania alergicznego kontaktowego działania uczulającego, ponieważ w przeciwieństwie do B.6 i wytycznej OECD dotyczącej badania nr 406, LLNA: BrdU-ELISA nie wymaga wywoływania reakcji nadwrażliwości skóry poprzez prowokację. Ponadto LLNA: BrdU-ELISA nie wymaga zastosowania adiuwanta, jak wymaga tego test maksymalizacji na świnkach morskich (rozdział B.6 niniejszego załącznika, 13). Tym samym LLNA: BrdU-ELISA zmniejsza cierpienie zwierząt. Niezależnie od przewagi LLNA: BrdU-ELISA nad metodami B.6 i wytyczną OECD dotyczącą badań nr 406 (13), należy przyznać, że istnieją pewne ograniczenia, które mogą spowodować konieczność wykorzystania B.6 lub wytycznej OECD dotyczącej badań nr 406 (np. w przypadku badania niektórych metali, z uwagi na fałszywe wyniki pozytywne w przypadku niektórych środków drażniących skórę [takich jak niektóre substancje powierzchniowo czynne] (6) (1, i rozdział B.42 niniejszego załącznika), lub rozpuszczalność badanej substancji). Ponadto klasy chemiczne lub substancje zawierające grupy funkcjonalne, co do których wykazano, że działają jako potencjalne czynniki zakłócające (15), mogą wymagać użycia badań na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD dotyczącej badań nr 406 (13)). Zalecono stosowanie ograniczeń wskazanych w LLNA (1 oraz rozdział B.42 w niniejszym załączniku) również w odniesieniu do LLNA: BrdU-ELISA (10). Poza tymi przypadkami zidentyfikowanych ograniczeń, LLNA: BrdU-ELISA powinna być stosowana do badania wszelkich substancji, chyba że istnieją właściwości związane z tymi substancjami, które mogą zakłócać dokładność LLNA: BrdU-ELISA. Ponadto należy uwzględnić możliwość otrzymania pozytywnych wyników granicznych, gdy wartości wskaźnika stymulacji (SI) kształtują się pomiedzy 1,6 a 1,9 (zob. pkt 31–32). Opiera się to na bazie danych uzyskanej przy zatwierdzaniu 43 substancji z wykorzystaniem SI ≥ 1,6 (zob. pkt 6), gdzie za pomocą LLNA: BrdU-ELISA poprawnie zidentyfikowano wszystkie 32 LLNA czynniki uczulające, lecz niewłaściwie oznaczono dwie z 11 LLNA substancji nieuczulających o wartościach SI pomiędzy 1,6 i 1,9 (tj. graniczne wartości dodatnie) (10). Jednak w związku z tym, że ten sam zestaw danych był stosowany do ustalania wartości SI i obliczania przewidywalnych właściwości badania, przytoczone wyniki mogą być zawyżonym szacunkiem prawdziwych przewidywalnych właściwości.

ZASADA METODY BADANIA

6. Podstawowa zasada leżąca u podstaw LLNA: BrdU-ELISA zakłada, że czynniki uczulające wywołują proliferację limfocytów w węzłach chłonnych odprowadzających limfę z miejsca przyłożenia substancji badanej. Ta proliferacja jest proporcjonalna do zastosowanej dawki oraz potencjału zastosowanego alergenu i jest prostym środkiem uzyskania ilościowego pomiaru uczulenia. Proliferacja jest mierzona przez porównanie średniej proliferacji w każdej badanej grupie do średniej proliferacji w grupie kontrolnej otrzymującej nośnik (VC). Określa się stosunek średniej proliferacji w każdej grupie poddanej działaniu środka do średniej proliferacji w równoległej grupie VC, który jest nazywany wskaźnikiem stymulacji (SI) i powinien wynosić ≥ 1,6, zanim substancja badana zostanie zaklasyfikowana jako potencjalny czynnik uczulający skórę. Procedury opisane w niniejszym dokumencie są oparte na wykorzystaniu do pomiaru zawartości BrdU w celu wykrycia zwiększonej liczby komórek rozmnażających

▼M3

się wegetatywnie w odprowadzających usznych węzłach chłonnych. BrdU jest substancją analogiczną do tymidyny i jest na podobnej zasadzie włączana do DNA komórek rozmnażających się wegetatywnie. Pomiaru zjawiska włączania BrdU dokonuje się metodą ELISA, która wykorzystuje przeciwciało specyficzne dla BrdU oznakowane również za pomocą peroksydazy. Gdy dodaje się podłoże, peroksydaza reaguje z nim i daje w wyniku barwiony produkt, kwantyfikowany w danej absorbancji przy zastosowaniu czytnika do płytek ELISA.

OPIS BADANIA

Dobór gatunków zwierząt

7. Mysz jest gatunkiem preferowanym do tego badania. Badania walidacyjne dla LLNA: BrdU-ELISA były przeprowadzane wyłącznie na szczepie CBA/J, który z tego względu uznaje się za szczep preferowany (10) (12). Wykorzystuje się młode dorosłe samice myszy, które są nieródkami i nie są w ciąży. Na początku doświadczenia samice powinny mieć 8–12 tygodni, a zróżnicowanie mas ciała poszczególnych zwierząt powinno być minimalne i nie przekraczać 20 % średniej masy ciała. Można ewentualnie wykorzystać inne szczepy i samce, jeżeli dysponuje się danymi świadczącymi o tym, że nie istnieją znaczące różnice w reakcji na LLNA: BrdU-ELISA.

Warunki w pomieszczeniach dla zwierząt i pożywienie

8. Myszy powinny być trzymane w grupach (16), chyba że istnieją odpowiednie naukowe przesłanki dla trzymania myszy pojedynczo. Temperatura w badawczych pomieszczeniach hodowlanych powinna wynosić 22 ± 3 °C. Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej.

Przygotowanie zwierząt

9. Zwierzęta wybierane są losowo i znakowane w sposób umożliwiający indywidualną identyfikację (ale nie przez jakiekolwiek znaki na uszach) i trzymane w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem dawkowania w celu umożliwienia zaaklimatyzowania do warunków laboratoryjnych. Przed rozpoczęciem podawania bada się wszystkie zwierzęta w celu upewnienia się, że nie mają żadnych zauważalnych zmian skórnych.

Przygotowanie roztworów dozujących

10. Stałe substancje powinny zostać rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczone, jeżeli jest to odpowiednie, przed zastosowaniem na uchu myszy. Chemikalia płynne można zastosować czyste lub rozcieńczone przed dawkowaniem. Chemikalia nierozpuszczalne, takie jak te najczęściej spotykane w wyrobach medycznych, należy poddać przesadnej ekstrakcji w odpowiednim rozpuszczalniku w celu wykrycia wszystkich możliwych do wyekstrahowania składników do badania przed zastosowaniem na uchu myszy. Substancje badane należy przygotowywać codziennie, chyba że dane dotyczące stabilności wykazują dopuszczalność składowania.

Sprawdzenie wiarygodności

11. Pozytywne substancje kontrolne (PC) wykorzystuje się do wykazania właściwego działania badania poprzez reakcję badanej substancji uczulającej z odpowiednią i powtarzalną czułością, dla której wielkość reakcji jest dobrze scharakteryzowana. Włączanie kolejnych PC jest zalecane, ponieważ potwierdza się w ten sposób kompetencje laboratorium do

▼M3

skutecznego przeprowadzenia każdego badania i umożliwia dokonanie oceny odtwarzalności i porównywalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej. Niektóre organy regulacyjne mogą wymagać także PC dla każdego badania i w związku z tym zachęca się użytkowników do konsultacji z właściwymi organami przed rozpoczęciem LLNA: BrdU-ELISA. Odpowiednio zaleca się rutynowe wykorzystywanie równoległej PC, aby uniknąć potrzeby dodatkowych badań na zwierzętach do spełnienia tych wymagań, które mogą powstać w związku ze stosowaniem okresowej PC (zob. pkt 12). PC powinna dawać pozytywną reakcję na badanie LLNA: BrdU-ELISA przy takim poziomie narażenia, przy którym oczekuje się wzrostu SI ≥ 1,6 w grupie kontroli negatywnej (NC). Dawkę PC należy dobrać w taki sposób, by nie powodować nadmiernego podrażnienia skóry lub ogólnoustrojowej toksyczności, a indukcja była powtarzalna, ale nie nadmierna (tj. SI > 14 byłyby uznane za zbyt wysokie). Preferowane PC to 25 % aldehyd cynamonowy heksylu (nr CAS 101-86-0) i 25 % eugenol (nr CAS 97-53-0) w acetonie: oliwa z oliwek (w proporcji objętościowej 4:1 v/v). Mogą zaistnieć okoliczności, w których można użyć innych PC spełniających powyższe kryteria, pod warunkiem że istnieje po temu odpowiednie uzasadnienie.

12. Podczas gdy włączenie równoległej grupy PC jest zalecane, mogą zaistnieć sytuacje, w których badanie okresowe PC (tj. w odstępach nie dłuższych niż 6 miesięcy) może okazać się wystarczające w przypadku laboratoriów przeprowadzających badanie LLNA: BrdU-ELISA regularnie (tj. przeprowadzających badanie LLNA: BrdU-ELISA nie rzadziej niż raz na miesiąc) i dysponują wcześniejszymi danymi z pozytywnych kontroli, świadczącymi o tym, że laboratorium jest w stanie uzyskiwać odtwarzalne i dokładne wyniki w pozytywnych kontrolach. Można wykazać odpowiedni poziom biegłości w wykonywaniu badania LLNA BrdU-ELISA, uzyskując stałe pozytywne wyniki PC w co najmniej 10 niezależnych badaniach przeprowadzonych w rozsądnym terminie (tj. w okresie krótszym niż rok).

13. Należy zawsze włączać równoległą grupę PC, jeśli zachodzi proceduralna zmiana w LLNA: BrdU-ELISA (np. zmiana przeszkolonego personelu, zmiany w metodzie badania materiałów i/lub odczynników, zmiany w metodzie badania urządzenia, zmiana źródła zwierząt badanych), a przedmiotowe zmiany powinny być udokumentowane w laboratoryjnych sprawozdaniach. Należy zwrócić uwagę na wpływ tych zmian na odpowiedniość ustalonych wcześniej danych przy określaniu konieczności zgromadzenia nowej bazy danych, aby udokumentować spójność wyników PC.

14. Badacze powinni być świadomi, że decyzja o przeprowadzeniu badania PC na zasadzie okresowej zamiast równolegle wywiera wpływ na odpowiedniość i akceptowalność negatywnych wyników badań uzyskanych bez równoległej PC w okresie pomiędzy każdym okresowym badaniem PC. Na przykład, jeżeli w okresowych PC uzyskany zostaje wynik fałszywie negatywny, negatywne wyniki substancji badanej uzyskane w okresie między ostatnim dopuszczalnym okresowym badaniem PC i niedopuszczalnym okresowym badaniem PC mogą być kwestionowane. Należy dokładnie rozważyć tego rodzaju skutki przy podejmowaniu decyzji, czy należy włączyć równoległą PC, czy tylko przeprowadzać PC na zasadzie okresowej. Należy również wziąć pod uwagę możliwość wykorzystania mniejszej liczby zwierząt w ramach grupy równoległej PC, jeżeli jest to naukowo uzasadnione, oraz jeżeli laboratorium może wykazać, w oparciu o wcześniej zgromadzone dane, że można wykorzystać mniejszą liczbę myszy (17).

15. Chociaż substancja kontroli pozytywnej powinna być testowana w nośniku, o którym wiadomo, że wywołuje konsekwentną reakcję (np. aceton: oliwa z oliwek; w proporcji objętościowej 4:1, v/v), mogą jednak zaistnieć pewne sytuacje wynikające z przepisów, w których przetestowanie w niestandardowym nośniku (o formulacji odpowiedniej klinicznie/chemicznie) może być również konieczne (18). Jeżeli równoległa PC jest badana w innym nośniku niż substancja badana, wówczas należy włączyć oddzielną VC w odniesieniu do równoległej PC.

▼M3

16. W przypadkach gdy ocenia się substancje badane konkretnej klasy chemicznej lub dające pewien zakres reakcji, substancje wzorcowe mogą służyć także temu, aby wykazać, czy metoda badawcza jest odpowiednia dla dokonania oceny potencjalnego działania uczulającego na skórę tego rodzaju badanych substancji. Odpowiednie substancje wzorcowe powinny posiadać następujące właściwości:

— strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do klasy badanej substancji,

— znane właściwości fizyczne i chemiczne,

— dane potwierdzające z LLNA: BrdU-ELISA,

— dane potwierdzające z innych modeli zwierzęcych i/lub ludzkich.

PROCEDURA BADANIA

Liczba zwierząt i poziomy dawek

17. W każdej grupie badanej powinny być wykorzystane nie mniej niż cztery zwierzęta, z minimalną liczbą trzech stężeń substancji badanej oraz równoległą grupą NC otrzymującą jedynie nośnik substancji badanej i grupą kontrolną PC (równoległą lub najnowszą, na podstawie polityki laboratoryjnej, biorąc pod uwagę pkt 11–15). Należy rozważyć zbadanie wielu dawek PC, szczególnie gdy badanie PC jest przeprowadzane na zasadzie nieregularnej. Z wyjątkiem zastosowania substancji badanej, ze zwierzętami grup kontrolnych należy się obchodzić w sposób identyczny jak ze zwierzętami grup badanych.

18. Wybór dawek i nośnika powinien być oparty na zaleceniach podanych w pozycjach 2 i 19. Kolejne dawki zazwyczaj wybiera się z odpowiedniego szeregu stężeń takich jak 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % itd. Do wyboru szeregu stężeń należy dołączyć odpowiednie naukowe uzasadnienie. O ile są dostępne, należy uwzględnić wszystkie istniejące informacje toksykologiczne (np. o ostrej toksyczności i o podrażnieniu skóry) oraz o strukturalnych i fizykochemicznych właściwościach badanej substancji (i/lub substancji zbliżonych pod względem budowy) przy wyborze trzech kolejnych stężeń, tak aby najwyższe stężenie maksymalizowało narażenie, nie doprowadzając jednak do ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry (19) (20 i rozdział B.4 niniejszego załącznika). W przypadku braku takich informacji może okazać się konieczne przeprowadzenie badania wstępnego (zob. pkt 21–24).

19. Nośnik nie powinien zakłócać wyniku badania lub wpływać na niego oraz powinien być wybrany na podstawie maksymalizowania rozpuszczalności w celu uzyskania najwyższego osiągalnego stężenia, dając jednocześnie możliwość uzyskania roztworu/zawiesiny nadającej się do podania substancji badanej. Zalecanymi nośnikami są aceton: oliwa z oliwek (w proporcji objętościowej 4:1 v/v), N,N-dimetyloformamid, metylo etylo keton, glikol propylenowy i sulfotlenek dimetylowy (6), ale mogą być użyte inne, jeśli przedstawi się wystarczające uzasadnienie naukowe. W niektórych sytuacjach może okazać się konieczne użycie, jako dodatkowej kontroli, rozpuszczalnika odpowiedniego ze względów klinicznych, lub postaci handlowej, w której badana substancja wprowadzana jest na rynek. Szczególną uwagę należy zwrócić na zapewnienie, aby hydrofilne substancje badane zostały włączone do systemu nośnika, który nawilża skórę i nie spływa z niej natychmiast, przez włączenie odpowiednich środków zwiększających rozpuszczalność (np. 1 % Pluronic ® L92). A zatem należy unikać roztworów całkowicie wodnych.

▼M3

20. Przetwarzanie węzłów chłonnych z poszczególnych myszy umożliwia ocenę zmienności pomiędzy zwierzętami oraz statystyczne porównanie różnicy między substancją badaną i pomiarami grupy VC (zob. pkt 33). Ponadto dokonanie oceny możliwości obniżenia liczby myszy w grupie PC jest wykonalne jedynie wówczas, gdy gromadzone są dane dotyczące poszczególnych zwierząt (17). Co więcej, niektóre organy regulacyjne wymagają zbierania danych dotyczących poszczególnych zwierząt. Regularne gromadzenie danych dotyczących poszczególnych zwierząt stanowi o dobrostanie zwierząt dzięki temu, że unika się powielania badań, do którego dochodziłoby w przypadku, gdyby wyniki dotyczące substancji badanej pierwotnie zebrane w jeden sposób (np. poprzez połączenie danych dotyczących zwierząt) miały zostać rozpatrzone w późniejszym terminie przez organy regulacyjne zgodnie z innymi wymogami (np. w ramach danych dotyczących poszczególnych zwierząt).

Badanie wstępne

21. W przypadku braku informacji pozwalającej określić najwyższą dawkę, jaka ma zostać zbadana (zob. pkt 18), należy przeprowadzić badanie wstępne w celu określenia właściwego poziomu dawki do badania w metodzie LLNA: BrdU-ELISA. Celem badania wstępnego jest uzyskanie wytycznych na temat wyboru maksymalnej dawki, jaka może być stosowana w głównym badaniu LLNA: BrdU-ELISA, w przypadku gdy nie dysponuje się informacjami na temat stężenia powodującego toksyczność ogólnoustrojową (zob. pkt 24) i/lub nadmierne miejscowe podrażnienie skóry (zob. pkt 23). Maksymalny poziom badanej dawki powinien wynosić 100 % stężenia substancji badanej w przypadku cieczy lub maksymalne możliwe stężenie w przypadku ciał stałych lub zawiesin.

22. Badanie wstępne przeprowadza się w warunkach identycznych do tych, w jakich przeprowadza się główne badanie LLNA: BrdU-ELISA, z tym że nie przeprowadza się oceny proliferacji węzła chłonnego oraz można wykorzystać mniejszą liczbę zwierząt w grupie badanej. Zaleca się jedno lub dwa zwierzęta w grupie badanej. Wszystkie myszy będą obserwowane codziennie pod kątem jakichkolwiek klinicznych oznak toksyczności ogólnoustrojowej lub miejscowego podrażnienia skóry w miejscu zastosowania. Masy ciała są rejestrowane przed badaniem i przed jego zakończeniem (dzień 6.). Obydwoje uszu każdej myszy bada się pod kątem wystąpienia rumienia i ocenia przy wykorzystaniu tabeli 1 (pkt 20 oraz rozdział B.4 niniejszego załącznika). Pomiary grubości ucha są przeprowadzane przy wykorzystaniu grubościomierza (np. cyfrowych mikrometrów lub grubościomierzem Peacock Dial) w dniu 1. (przed podaniem substancji), w dniu 3. (około 48 godzin następujących po podaniu pierwszej dawki) oraz w dniu 6. Ponadto w dniu 6. grubość ucha można określić za pomocą kolczykownicy do pomiaru masy, co powinno być przeprowadzone po uśmierceniu zwierząt w humanitarny sposób. Nadmierne miejscowe podrażnienie skóry jest sygnalizowane przez rumień o wyniku ≥ 3 i/lub zwiększenie grubości ucha o ≥ 25 % w dniu pomiaru (21) (22). Najwyższa dawka wybrana do głównego badania LLNA: BrdU-ELISA to następna niższa dawka w szeregu stężeń badania wstępnego (zob. pkt 18), która nie wywołuje ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry.

Tabela 1

Ocena punktowa rumienia

Objawy	Wynik
Brak rumienia	0
Bardzo lekki rumień (prawie niewidoczny)	1
Wyraźny rumień	2

▼M3

Objawy	Wynik
Rumień umiarkowany do mocnego	3
Mocny rumień (czerwień przypominająca barwę mięsa czerwonego) do form obrzęku wykluczających klasyfikację rumienia	4

23. Oprócz 25 % zwiększenia grubości ucha (21) (22), do zidentyfikowania substancji drażniących w metodzie LLNA wykorzystywano też statystycznie istotne zwiększenie grubości ucha u myszy badanych w porównaniu do myszy kontrolnych (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). O ile jednak statystycznie znaczące zwiększenie może wystąpić przy grubości ucha mniejszej niż 25 %, to nie udało się go powiązać z nadmiernym podrażnieniem (25) (26) (27) (28) (29).

24. Następujące obserwacje kliniczne mogą wskazywać na toksyczność ogólnoustrojową (30), jeśli są wykorzystywane jako część zintegrowanej oceny i w związku z tym mogą określać maksymalne dawki do stosowania w LLNA: BrdU-ELISA: zmiany w funkcjach układu nerwowego (np. piloerekcja, ataksja, drżenia, oraz konwulsje); zmiany w zachowaniu (na przykład agresja, zmiany w czyszczeniu, wyraźna zmiana w poziomie aktywności); zmiany w sposobie oddychania (np. zmiany w częstotliwości i intensywności oddychania, takie jak duszność, dyszenie oraz rzężenie), a także zmiany w konsumpcji żywności i wody. Ponadto w ocenie należy wziąć pod uwagę oznaki stanów zwiększonej senności i/lub brak reakcji oraz wszelkie objawy kliniczne sygnalizujące coś więcej niż chwilowy ból i cierpienie, lub > 5 % spadek masy ciała od dnia 1. do dnia 6. czy śmiertelność. Zwierzęta konające oraz zwierzęta wykazujące objawy silnego bólu i zagrożenia należy humanitarnie uśmiercić (31).

Harmonogram doświadczalny głównego badania

25. Harmonogram doświadczalny badania jest następujący:

— *Dzień 1:* Indywidualnie określić i odnotować wagę każdego zwierzęcia oraz wszelkie obserwacje kliniczne. Stosuje się 25 µl właściwego roztworu lub samego nośnika, lub kontroli pozytywnej (równoległej lub najnowszej, na podstawie polityki laboratoryjnej, bierze się pod uwagę pkt 11–15), na część grzbietową każdego ucha.

— *Dzień 2 i 3:* Powtórzyć procedurę stosowania przeprowadzoną w dniu 1.

— *Dzień 4:* Bez podawania.

— *Dzień 5:* Wstrzyknąć 0,5 mL (5 mg/mysz) roztworu BrdU (10 mg/mL) wewnątrzotrzewnowo.

— *Dzień 6:* Zanotować wagę każdego zwierzęcia oraz wszelkie obserwacje kliniczne. W około 24 godziny (24 h) po wstrzyknięciu BrdU należy uśmiercić w sposób humanitarny zwierzęta. Wyciąć uszne węzły chłonne z każdego ucha myszy i przetwarzać oddzielnie w roztworze chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) dla każdego zwierzęcia. Informacje i schematy identyfikacji i rozbioru węzła chłonnego można znaleźć w pozycji (17). Do celów dalszego monitorowania miejscowych reakcji skóry w badaniu głównym, w protokole badania można uwzględnić dodatkowe parametry, takie jak punktacja rumienia ucha lub pomiar grubości ucha (zrobiony za pomocą grubościomierza lub za pomocą kolczykownicy do pomiaru masy w czasie sekcji).

▼M3

Przygotowanie zawiesiny komórek

26. Zostaje przygotowana jedna wspólna porcja zawiesiny z komórek węzła chłonnego (LNC) usuniętych obustronnie u każdej myszy przez delikatne mechaniczne rozdzielenie agregatów na siateczce ze stali nierdzewnej o oczkach wielkości 200 μm lub za pomocą innych możliwych do przyjęcia technik służących tworzeniu jednokomórkowych zawiesin (np. wykorzystując jednorazowe plastikowe tłuczki do zgniecenia węzłów chłonnych, a następnie przesiewając je przez nylonową siatkę #70). Procedura przygotowania zawiesiny LNC ma zasadnicze znaczenie w tym badaniu, zatem każdy operator powinien ustanowić technikę z wyprzedzeniem. Ponadto węzły chłonne u zwierząt z grupy kontroli negatywnej są niewielkie, tak więc ostrożne działanie ma istotne znaczenie dla uniknięcia sztucznego wpływu na wartości SI. W każdym przypadku docelowa objętość zawiesiny LNC powinna zostać dostosowana do określonej zoptymalizowanej objętości (około 15 mL). Objętość zoptymalizowana opiera się na osiągnięciu średniej absorpcji w grupie NC w zakresie 0,1– 0,2.

Określenie proliferacji komórkowych (pomiar zawartości BrdU w DNA limfocytów)

27. BrdU mierzy się za pomocą ELISA przy użyciu zestawu dostępnego w handlu (np. Roche Applied Science, Mannheim, Niemcy, nr w katalogu 11 647 229 001). Krótko rzecz ujmując, 100 μL zawiesiny LNC dodaje się do zagłębień w płaskodennej płytce w trzech egzemplarzach. Po utrwaleniu i denaturacji LNC dodaje się przeciwciało anty-BrdU do każdego zagłębienia i umożliwia reakcję. Następnie przeciwciało anty-BrdU jest usuwane poprzez płukanie, dodaje się roztwór podłoża i umożliwia wytworzenie chromogenu. Następnie mierzy się absorbancję przy 370 nm ze wzorcową długością fali 492 nm. We wszystkich przypadkach należy zoptymalizować warunki badania (zob. pkt 26).

OBSERWACJE

Obserwacje kliniczne

28. Zwierzęta poddaje się starannej obserwacji klinicznej raz dziennie pod kątem jakichkolwiek oznak klinicznych, czy to miejscowego podrażnienia w miejscu zastosowania, czy też ogólnoustrojowej toksyczności. Wszystkie obserwacje kliniczne są systematycznie odnotowywane w postaci zapisów prowadzonych dla każdej myszy. Plany monitorowania powinny obejmować kryteria umożliwiające szybką identyfikację tych myszy, które wykazują oznaki toksyczności ogólnoustrojowej, nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry lub żrącego działania na skórę, w celu eutanazji (31).

Masy ciała

29. Jak wskazano w pkt 25, indywidualne masy ciała określane są na początku badania i przy planowanym humanitarnym uśmierceniu zwierząt.

OBLICZANIE WYNIKÓW

30. Wyniki dla każdej grupy badanej są wyrażane jako średni SI. SI otrzymuje się, dzieląc średnią wartość wskaźnika proliferacyjnego BrdU w obrębie każdej grupy substancji badanej i grupie PC przez średnią wartość wskaźnika proliferacyjnego BrdU w grupie badanej z zastosowaniem rozpuszczalnika/VC. Średnie SI dla grup VC wynosi zatem jeden.

Wskaźnik proliferacyjny BrdU definiuje się jako:

$$\text{wskaźnik proliferacyjny BrdU} = (ABS_{em} - ABS\ blank_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ blank_{ref})$$

gdzie; em = długość fali emisji; a ref = wzorcowa długości fali.

▼M3

31. W procesie decyzyjnym wynik uznawany jest za pozytywny, jeśli SI ≥ 1,6 (10). Jednakże siła reakcji na dawkę, znaczenie statystyczne i spójność reakcji rozpuszczalnik/nośnik i PC mogą również być stosowane przy ustalaniu, czy wynik graniczny (tj. wartość SI pomiędzy 1,6 a 1,9) można uznać za pozytywny (3) (6) (32).

32. W przypadku granicznego wyniku pozytywnego o wartości SI pomiędzy 1,6 i 1,9 użytkownicy mogą rozważyć dodatkowe informacje, takie jak relacja dawka-reakcja, oznaki toksyczności ogólnoustrojowej lub nadmiernego podrażnienia oraz, w stosownych przypadkach, istotność statystyczna wraz z wartościami SI w celu potwierdzenia, czy wyniki te są pozytywne (10). Należy również rozważyć różne własności substancji badanej, w tym rozważyć, czy jest ona strukturalnie pokrewna znanym czynnikom uczulającym, czy powoduje nadmierne podrażnienie skóry u myszy, oraz zaobserwowany charakter relacji dawka-reakcja. Te i inne względy omówione są szczegółowo gdzie indziej (4).

33. Gromadzenie danych dotyczących poszczególnych myszy umożliwi analizę statystyczną danych w odniesieniu do obecności i relacji dawka-reakcja. Ocena statystyczna może obejmować ocenę relacji między dawką a reakcją, jak również odpowiednio dostosowane porównania badanych grup (np. grupę badaną w parach w porównaniu z równoległą grupą kontrolną otrzymującą nośnik/rozpuszczalnik). Analizy statystyczne mogą obejmować np. regresję liniową lub badanie Williamsa w celu dokonania oceny tendencji w relacji między dawką a reakcją oraz badanie Dunnetta w odniesieniu do porównań par. Przy wyborze właściwej metody analizy statystycznej danych prowadzący badanie powinien zachować świadomość możliwej nierówności wariancji lub innych powiązanych problemów, które mogą spowodować konieczność transformacji danych lub przeprowadzenia nieparametrycznej analizy statystycznej. W każdym przypadku prowadzący badanie musi liczyć się z koniecznością przeprowadzenia obliczeń SI i analiz statystycznych z wykorzystaniem pewnych punktów danych i bez nich (tzw. „wartości odstające”).

DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Dane

34. Dane powinny być podsumowane w formie tabelarycznej pokazującej wartości wskaźnika proliferacyjnego BrdU odnoszące się do poszczególnych zwierząt, średnie wartości wskaźnika proliferacyjnego BrdU/zwierzę w danej grupie, związana wartość błędu (np. SD, SEM) oraz średnie SI dla każdej grupy badanej w porównaniu z równoległą grupą kontrolną z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika.

Sprawozdanie z badań

35. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badane i kontrolne substancje chemiczne:

— numery identyfikujące (np. CAS lub WE, jeśli są dostępne); źródło: czystość; znane zanieczyszczenia; numer partii),

— cechy fizyczne i własności fizykochemiczne (np. lotność, stabilność, rozpuszczalność),

— jeżeli jest to mieszanina, skład i względne udziały procentowe składników.

Rozpuszczalnik/nośnik:

— dane identyfikacyjne (czystość; stężenie, tam gdzie stosowne; wykorzystane objętości),

— uzasadnienie wyboru nośnika.

▼M3

Zwierzęta badane:

— źródło, z którego pochodzą myszy szczepu CBA,

— status mikrobiologiczny zwierząt, jeśli jest znany,

— liczba i wiek zwierząt,

— źródło pochodzenia zwierząt, warunki środowiska, pokarm itp.

Warunki badania:

— źródła, numer partii i dane producenta dotyczące zapewniania/kontroli jakości dla zestawu ELISA,

— szczegóły przygotowania i stosowania substancji badanej,

— uzasadnienie doboru dawek (łącznie z wynikami z badania wstępnego, jeśli było przeprowadzane),

— nośnik i użyte stężenia substancji testowej oraz całkowita ilość zastosowanej substancji badanej,

— szczegóły dotyczące jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety, źródło wody),

— szczegóły dotyczące poddania działaniu substancji oraz harmonogramów pobierania próbek,

— metody pomiaru toksyczności,

— kryteria uznawania badań za pozytywne lub negatywne,

— szczegóły dotyczące protokołu odchyleń i wyjaśnienie, w jaki sposób odchylenie ma wpływ na planowanie badań i ich wyniki.

Sprawdzenie wiarygodności:

— podsumowanie wyników ostatniego sprawdzenia wiarygodności badań, w tym informacji o wykorzystanej substancji badanej, stężeniach i nośniku,

— dane dotyczące równoległej lub wcześniejszej kontroli pozytywnej i dotyczące równoległej negatywnej (rozpuszczalnik/nośnik) kontroli z laboratorium testującego,

— jeżeli nie włączono równoległej grupy PC, data i sprawozdanie laboratoryjne z ostatniego okresowego PC i sprawozdanie wyszczególniające wcześniejsze dane dotyczące PC dla danego laboratorium, uzasadniające przyczyny dla których nie przeprowadzono PC równolegle.

Wyniki:

— masa poszczególnych myszy na początku dawkowania i przy planowanym humanitarnym uśmierceniu; jak również średnia i opis powiązanego błędu (np. SD, SEM) w odniesieniu do każdej grupy badanej,

— przebieg czasowy pojawienia się i oznaki toksyczności, w tym podrażnień skóry w miejscu podania, jeśli takie wystąpiły, u każdego zwierzęcia,

— tabelę wskaźników proliferacyjnych BrdU dla poszczególnych myszy i wartości SI dla każdej grupy badanej,

— średni oraz powiązany okres błędu (np. SD, SEM) dla wskaźnika proliferacyjnego BrdU//mysz dla każdej grupy badanej i wyniki analizy obserwacji nietypowych dla każdej grupy badanej,

▼M3

— obliczone SI i właściwe pomiary zmienności, uwzględniające zmienność pomiędzy zwierzętami w odniesieniu do grup substancji badanej i grup kontrolnych,

— relacja dawka-reakcja,

— analizy statystyczne, tam gdzie stosowne.

Omówienie wyników:

— krótki komentarz do wyników, analiza zależności reakcji od dawki oraz w stosownych przypadkach, analizy statystyczne, z wnioskiem, czy substancja testowa powinna być uznana za czynnik uczulający skórę.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paryż. Dostępny na stronie: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327–33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Dostępny na stronie: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostępny na stronie: [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. Dostępny na stronie: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129–134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paryż. Dostępny na stronie: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostępny na stronie: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71–89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13–31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paryż. Dostępny na stronie: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostępny na stronie: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83–94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245–256.

▼**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, 491–506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60–68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721–728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023–1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostępny na stronie: [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, Paryż. Dostępny na stronie: [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, 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, Paryż. Dostępny na stronie: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: bliskość zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badania (33).

Substancja wzorcowa: uczulająca lub nieuczulajaca substancja wykorzystywana jako norma dla celów porównania z substancją badaną. Substancja wzorcowa powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji; (iii) znane właściwości fizyczne/chemiczne; (iv) dane uzupełniające, dotyczące znanych skutków; oraz (v) znaną siłę działania w zakresie pożądanych reakcji.

Fałszywy wynik negatywny: substancja badana, która w wyniku zastosowania metody badania została oznaczona niewłaściwie jako negatywna lub nieaktywna, podczas gdy w rzeczywistości jest pozytywna lub aktywna (33).

Fałszywy wynik pozytywny: substancja badana, która w wyniku zastosowania metody badania została oznaczona niewłaściwie jako pozytywna lub aktywna, podczas gdy w rzeczywistości jest negatywna lub nieaktywna (33).

Zagrożenie: możliwość wywierania negatywnego wpływu na zdrowie lub środowisko. Niekorzystny wpływ przejawia się tylko wtedy, gdy istnieje wystarczające narażenie.

Odtwarzalność międzylaboratoryjna: miernik zakresu, w jakim różne wykwalifikowane laboratoria, przy użyciu tego samego protokołu i testując tę samą badaną substancję, mogą przynieść jakościowo i ilościowo podobne wyniki. Odtwarzalność międzylaboratoryjna jest określana w procesach poprzedzających walidację i obejmujących walidację i wskazuje, w jakim stopniu badanie można z powodzeniem przekazywać między laboratoriami: nazywana jest również odtwarzalnością międzylaboratoryjną (33).

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna: ustalenie stopnia, w jakim wykwalifikowani pracownicy w tym samym laboratorium mogą z powodzeniem odtworzyć wyniki, stosując szczegółowy protokół w różnych momentach. Nazywana również odtwarzalnością laboratoryjną (33).

Wynik odstający: wynik odstający jest obserwacją, która znacznie różni się od innych wartości w losowej próbce z populacji.

Zapewnienie jakości: proces zarządzania, w którym przestrzeganie norm i wymogów w zakresie badań laboratoryjnych oraz procedur dotyczących dokumentacji i dokładności przekazywania danych jest oceniane przez osoby niezależne od tych, które przeprowadzają badania.

Wiarygodność: miernik zakresu, w jakim metoda badania może zostać wykonana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami w dłuższym okresie czasu, w przypadku jej wykonywania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej (33).

Działanie uczulające na skórę: proces immunologiczny, do którego dochodzi w przypadku, gdy osobnik wrażliwy jest narażony miejscowo na wywołujący uczulenie chemiczny alergen, powodujący immunologiczną reakcję skórną, co może prowadzić do uczulania przez kontakt ze skórą.

Wskaźnik stymulacji (SI): wartość obliczona dla oceny potencjalnego działania uczulającego na skórę przez substancję badaną, który wyraża się stosunkiem proliferacji w grupach poddanych działaniu środka do proliferacji w równoległej grupie kontrolnej nośnika.

Substancja badana (określana także jako badana substancja chemiczna): każda substancja lub mieszanina, badana za pomocą niniejszej TM.

▼M4

B.52. OSTRA TOKSYCZNOŚĆ INHALACYJNA – METODA KLAS OSTREJ TOKSYCZNOŚCI

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna dotyczącej badań wytycznej OECD nr 436 (2009). Dotyczącą badań ostrej toksyczności inhalacyjnej wytyczną nr 403 przyjęto po raz pierwszy w 1981 r., następnie jednak wprowadzano do niej zmiany (zob. rozdział B.2 niniejszego załącznika (1)). Opracowanie metody klas ostrej toksyczności dla toksyczności inhalacyjnej (2) (3) (4) uznano za właściwe po przyjęciu zmienionej metody klas ostrej toksyczności dla toksyczności doustnej (rozdział B.1 tris niniejszego załącznika) (5). Retrospektywna ocena działania badawczej metody klas ostrej toksyczności dla ostrej toksyczności inhalacyjnej wykazała, że metoda ta jest odpowiednia do zastosowania na potrzeby klasyfikacji i oznakowania (6). Badawcza metoda klas ostrej toksyczności dla toksyczności inhalacyjnej pozwoli na przeprowadzenie szeregu działań z zastosowaniem określonych stężeń docelowych w celu ustanowienia klasyfikacji toksyczności badanej substancji chemicznej. Jako kluczowy punkt końcowy stosuje się śmiertelność, jednak zwierzęta doświadczające silnego bólu lub stresu, cierpiące lub które nieuchronnie czeka zgon, należy w humanitarny sposób uśmiercić w celu zminimalizowania ich cierpienia. Wytyczne dotyczące humanitarnego punktu końcowego są dostępne w wytycznych OECD nr 19 (7).

2. Wytyczne dotyczące przeprowadzania i interpretacji wyników niniejszej metody badawczej można znaleźć w dotyczących badania ostrej toksyczności inhalacyjnej wytycznych nr 39 (GD 39) (8).

3. Definicje zastosowane w kontekście niniejszej metody badawczej przedstawiono w dodatku 1 oraz w GD 39 (8).

4. Niniejsza metoda badawcza umożliwia uzyskanie informacji na temat niebezpiecznych właściwości badanej substancji chemicznej oraz pozwala na jej ocenę i klasyfikację zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008 dotyczącym klasyfikacji substancji chemicznych powodujących ostrą toksyczność (9). Jeśli wymagana jest estymacja punktowa wartości LC_{50} lub analizy zależności stężenie-odpowiedź, odpowiednią metodą badawczą, jaką należy zastosować, jest metoda opisana w rozdziale B.2 niniejszego załącznika (1). Dalsze wytyczne dotyczące wyboru metody badawczej można znaleźć w GD 39 (8). Niniejsza metoda badawcza nie jest w szczególności przeznaczona do badania materiałów specjalnych, takich jak słabo rozpuszczalne materiały izometryczne lub włókniste czy też wytworzone nanomateriały.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

5. Aby zminimalizować wykorzystanie zwierząt, przed rozważeniem wykonania badania według niniejszej metody badawczej laboratorium badawcze powinno wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej, w tym wyniki istniejących badań, dzięki którym można byłoby uniknąć wykonywania dodatkowych badań. Informacje, które mogą być pomocne w doborze najbardziej odpowiedniego gatunku, szczepu, płci, sposobu narażenia oraz odpowiednich stężeń do badania obejmują nazwę, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*; spodziewane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR oraz dane toksykologiczne na temat strukturalnie powiązanych związków. Stężeń, w przypadku których przewiduje się, że powodują silny ból i stres z powodu swojego działania żrącego ([1]) lub silnie drażniącego, nie należy badać za pomocą niniejszej metody badawczej [zob. GD 39 (8)].

([1]) Do oceny działania żrącego można wykorzystać ocenę specjalistyczną opartą na takich dowodach, jak: wyniki badań z udziałem ludzi lub zwierząt, istniejące dane (*in vitro*), np. rozdział B.40 (10), B.40 bis (11) niniejszego załącznika lub wytyczna OECD TG 435 (12), wartości pH, informacje dotyczące podobnych substancji chemicznych lub inne istotne dane.

▼M4

ZASADA BADANIA

6. Zasada niniejszego badania polega na uzyskaniu wystarczających informacji na temat ostrej toksyczności inhalacyjnej badanej substancji chemicznej za pomocą procedury sekwencyjnej podczas okresu narażenia trwającego 4 godziny, w celu umożliwienia jej klasyfikacji. Dla poszczególnych celów regulacyjnych mogą obowiązywać inne czasy trwania narażenia. Na każdym etapie badania z określonym stężeniem bada się 3 zwierzęta każdej płci. W zależności od upadkowości lub stanu agonalnego zwierząt do stwierdzenia ostrej toksyczności badanej substancji chemicznej mogą wystarczyć 2 etapy. Jeśli udowodniono, że jedna z płci jest bardziej podatna na działanie substancji, badanie można kontynuować z wykorzystaniem jedynie osobników takiej bardziej podatnej płci. Wynik poprzedniego etapu określi działania w ramach kolejnego etapu, na przykład:

a) dalsze badania nie są konieczne;

b) badanie trzech zwierząt każdej płci; lub

c) badanie z wykorzystaniem 6 zwierząt jedynie płci bardziej podatnej na działanie substancji, tj. szacunki niższych wartości granicznych klasy toksyczności należy oprzeć na badaniach z wykorzystaniem 6 zwierząt w każdej grupie otrzymującej określone stężenie, niezależnie od płci takich zwierząt.

7. Zwierzęta w stanie agonalnym lub zwierzęta wykazujące oczywiste oznaki bólu czy oznaki ostrego i przewlekłego stresu powinny zostać uśmiercone w humanitarny sposób i uwzględnione w interpretacji wyników badań w ten sam sposób, co zwierzęta padłe w trakcie badania. Kryteria podejmowania decyzji co do uśmiercenia zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących silny ból oraz wytyczne dotyczące rozpoznawania przewidywalnego lub nieuchronnie zbliżającego się zgonu zawarto w wytycznych OECD nr 19 dotyczących humanitarnego punktu końcowego (7).

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

8. Należy wykorzystać zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta pochodzące ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach. Preferowanym gatunkiem jest szczur, a w przypadku wykorzystania innego gatunku należy podać uzasadnienie.

Przygotowanie zwierząt

9. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. W dniu narażenia zwierzęta powinny być młodymi dorosłymi osobnikami w wieku 8-12 tygodni, a ich masa ciała powinna mieścić się w zakresie ± 20 % średniej masy dla każdej płci zwierząt w tym samym wieku poddanych uprzednio narażeniu. Zwierzęta wybiera się losowo i oznacza w sposób umożliwiający identyfikację poszczególnych osobników. Zwierzęta przetrzymuje się w klatkach przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania, aby umożliwić ich aklimatyzację do warunków laboratoryjnych. Zwierzęta powinny również być przyzwyczajane do przyrządów używanych w badaniu przez krótki okres przed rozpoczęciem badania, ponieważ zmniejszy to ich stres spowodowany wprowadzeniem do nowego środowiska.

Hodowla zwierząt

10. Temperatura w pomieszczeniach, w których przetrzymuje się zwierzęta doświadczalne, powinna wynosić 22 ± 3 °C. Najlepiej byłoby, gdyby wilgotność względna była utrzymywana w przedziale 30-70 %, chociaż może to być niemożliwe w przypadku stosowania wody jako nośnika. Przed narażeniem i po nim zwierzęta na ogół należy trzymać w klatkach w grupach podzielonych według płci i badanego stężenia, lecz liczba zwierząt w klatce nie powinna przeszkadzać w dokładnej obserwacji każdego zwierzęcia, a także powinna umożliwiać zminimalizowanie strat w zwierzętach spowodowanych kanibalizmem i walkami. Jeżeli zwierzęta mają być poddane narażeniu tylko przez nos, konieczne może być przyzwyczajenie ich do rur unieruchamiających. Rury unieruchamiające nie powinny powodować u zwierząt nadmiernego stresu fizycznego, termicznego ani stresu

▼M4

związanego z unieruchomieniem. Unieruchomienie może wpłynąć na fizjologiczne punkty końcowe, takie jak temperatura ciała (hipertermia) lub minutowa pojemność oddechowa. Jeżeli dostępne są dane ogólne, na podstawie których można wykazać, że takie zmiany nie występują w znaczącym stopniu, uprzednia adaptacja do rur unieruchamiających nie jest konieczna. Zwierzęta, których cała powierzchnia ciała jest narażana na działanie aerozolu, w trakcie narażenia powinny być trzymane oddzielnie, aby zapobiec filtrowaniu badanego aerozolu przez futro innych zwierząt w tej samej klatce. Można stosować konwencjonalne oraz certyfikowane pasze laboratoryjne, z wyjątkiem okresów poddawania narażeniu, podczas których stosuje się nieograniczony dostęp do wody pitnej z miejscowej instalacji wodociągowej. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności.

Komory inhalacyjne

11. Przy wyborze komory inhalacyjnej należy wziąć pod uwagę charakter badanej substancji chemicznej i cel badania. Preferowaną drogą narażenia jest narażenie tylko przez nos (pojęcie to obejmuje narażenie tylko głowy, narażenie tylko przez nos lub narażenie tylko pyska). Narażenie tylko przez nos jest na ogół preferowane w badaniach aerozoli ciekłych lub stałych oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole. Narażenie całego ciała może lepiej sprzyjać osiągnięciu szczególnych celów badania, taki wybór należy jednak uzasadnić w sprawozdaniu z badania. Aby zagwarantować stabilność atmosfery przy zastosowaniu komory do poddawania narażeniu całego ciała, całkowita objętość badanych zwierząt nie powinna przekraczać 5 % objętości komory. Zasady technik narażenia tylko przez nos i przez powierzchnię całego ciała oraz ich szczególne zalety i wady omówiono w GD 39 (8).

WARUNKI NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Stosowanie stężeń

12. Zaleca się stosowanie stałego okresu poddania narażeniu trwającego cztery godziny, z wyjątkiem okresu wyrównywania stężeń. W przypadku konieczności spełnienia konkretnych wymogów można zastosować inne okresy trwania narażenia, należy to jednak uzasadnić w sprawozdaniu z badania [zob. GD 39 (8)]. Zwierzęta poddane działaniu aerozoli w komorach do poddawania narażeniu całego ciała należy przetrzymywać pojedynczo, aby zapobiec połykaniu badanej substancji chemicznej przy wylizywaniu innych zwierząt znajdujących się w tej samej klatce. W okresie narażenia na działanie substancji należy wstrzymać podawanie paszy. Podczas całego okresu poddawania narażeniu całego ciała można zapewnić dostęp do wody.

13. Zwierzęta są poddawane narażaniu na działanie badanej substancji chemicznej w formie gazu, pary, aerozolu lub mieszaniny tych postaci. Stan fizyczny, który ma być przedmiotem badania, zależy od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, wybranego stężenia lub formy fizycznej, która najprawdopodobniej będzie występować podczas postępowania z badaną substancją chemiczną i jej stosowania. Badane substancje chemiczne o charakterze higroskopijnym oraz reaktywne chemicznie należy badać w suchej atmosferze. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć osiągnięcia stężenia wybuchowego.

Rozkład wielkości cząstek

14. W odniesieniu do wszystkich aerozoli oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole, należy dokonać klasyfikacji cząstek według wielkości. W celu umożliwienia narażenia na działanie danej substancji wszystkich odpowiednich części dróg oddechowych zaleca się aerozole o średnicy aerodynamicznej mediany rozkładu masowego (MMAD) wynoszącej od 1 do 4 μm przy geometrycznym standardowym odchyleniu (σ_g) równym od 1,5 do 3,0 (8) (13) (14). Należy dołożyć uzasadnionych starań, aby spełnić tę normę, jednak w razie niemożności jej osiągnięcia należy przedstawić specjalistyczną opinię. Przykładowo pary metali mogą zawierać cząstki mniejsze niż przewiduje to norma, a cząstki naładowane, włókna i materiały higroskopijne (których rozmiar zwiększa się w wilgotnym środowisku układu oddechowego) mogą tę normę przekraczać.

▼M4

Przygotowanie badanej substancji chemicznej w nośniku

15. Do uzyskania odpowiedniego stężenia i rozmiaru cząstek badanej substancji chemicznej w atmosferze można zastosować nośnik. Zasadniczo preferowanym nośnikiem powinna być woda. Materiały stałe można poddać obróbce mechanicznej w celu uzyskania wymaganego zróżnicowania wielkości cząstek, jednak należy zachować ostrożność, aby badana substancja chemiczna nie uległa rozkładowi ani zmianom. W przypadkach, w których można przypuszczać, że w wyniku procesów mechanicznych zmienił się skład badanej substancji chemicznej (np. w skrajnych temperaturach powstających na skutek tarcia przy nadmiernie intensywnym mieleniu), należy go zweryfikować metodami analitycznymi. Należy dołożyć odpowiednich starań, aby uniknąć zanieczyszczenia badanej substancji chemicznej. Nie ma potrzeby badania materiałów granulowanych niemających charakteru sypkiego, które są celowo przygotowywane tak, aby nie ulegały wdychaniu. Należy wykonać próbę na ścieranie w celu wykazania, że przy wykorzystywaniu materiału granulowanego nie powstają cząstki respirabilne. Jeżeli w wyniku próby na ścieranie powstaną cząstki respirabilne, należy wykonać badanie toksyczności inhalacyjnej.

Zwierzęta kontrolne

16. Wykorzystanie równoległej ujemnej (poddanej działaniu powietrza) grupy kontrolnej nie jest konieczne. W przypadku wykorzystania nośnika innego niż woda w celu wytworzenia atmosfery na potrzeby badania należy użyć grupy kontrolnej nośnika tylko wtedy, gdy brak jest dostępnych danych historycznych na temat toksyczności inhalacyjnej. Jeżeli badanie toksyczności dla badanej substancji chemicznej zmieszanej z nośnikiem nie wykaże toksyczności, wynika z tego, że dany nośnik jest nietoksyczny w badanych stężeniach, a zatem nie ma potrzeby tworzenia grupy kontrolnej nośnika.

MONITOROWANIE WARUNKÓW NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Przepływ powietrza w komorze

17. Przepływ powietrza przez komorę należy starannie kontrolować i monitorować w sposób ciagły, jak również rejestrować podczas narażania na działanie substancji nie rzadziej niż co godzinę. Monitorowanie stężenia (lub stabilności) badanej substancji w atmosferze uzyskanej na potrzeby badania jest integralnym pomiarem wszystkich parametrów dynamicznych i umożliwia w sposób pośredni kontrolę wszystkich istotnych parametrów dynamicznych w zakresie wytwarzania atmosfery. Należy w szczególności uwzględnić kwestię zapobiegania ponownemu wdychaniu w komorach przeznaczonych do narażenia wyłącznie przez nos w przypadkach, gdy przepływ powietrza przez układ podawania substancji jest nieodpowiedni do zapewnienia dynamicznego przepływu powietrza zawierającego badaną substancję chemiczną. Istnieją zalecane metody, które można zastosować do wykazania, że w wybranych warunkach ponowne wdychanie nie zachodzi (8) (15). Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 19 %, a stężenie dwutlenku węgla nie powinno przekraczać 1 %. Jeżeli istnieją powody, by przypuszczać, że norma ta nie może zostać osiągnięta, należy mierzyć stężenia tlenu i dwutlenku węgla.

Temperatura i wilgotność względna w komorze

18. W komorze należy utrzymywać temperaturę na poziomie 22 ± 3 °C. Wilgotność względną w strefie oddychania zwierząt – zarówno dla narażenia tylko przez nos, jak i dla narażenia całego ciała – należy monitorować i rejestrować co najmniej trzykrotnie podczas okresów poddawania działaniu substancji trwających do 4 godzin, a podczas okresów krótszych – co godzinę. Należy utrzymywać wilgotność względną w przedziale 30–70 %, choć może to być nieosiągalne (np. przy badaniu mieszanin opartych na wodzie) lub niemożliwe do zmierzenia w przypadku zakłócenia danej metody badawczej przez badaną substancję chemiczną.

▼M4

Badana substancja chemiczna: stężenie nominalne

19. Tam, gdzie to możliwe, należy obliczyć i zarejestrować stężenie nominalne w komorze badawczej. Stężenie nominalne jest to masa wytworzonej badanej substancji chemicznej podzielona przez całkowitą objętość powietrza przepuszczonego przez system komory. Stężenie nominalne nie służy do charakteryzowania narażenia zwierząt, lecz porównanie stężenia nominalnego i stężenia rzeczywistego umożliwia określenie w przybliżeniu efektywności wytwarzania substancji badanej w układzie badawczym, a tym samym można je wykorzystać do wykrywania problemów związanych z takim wytwarzaniem.

Badana substancja chemiczna: stężenie rzeczywiste

20. Stężenie rzeczywiste jest to stężenie badanej substancji chemicznej w strefie oddychania zwierząt w komorze inhalacyjnej. Stężenie rzeczywiste można uzyskać za pomocą metod swoistych (np. bezpośredniego pobierania próbek, metod adsorpcji lub reakcji chemicznej, a następnie charakterystyki analitycznej) lub metod nieswoistych, takich jak analiza grawimetryczna przy zastosowaniu filtra. Zastosowanie metody grawimetrycznej jest akceptowalne tylko w przypadku aerozoli proszkowych zawierających jeden składnik lub aerozoli cieczy o niskiej lotności i należy wtedy przed badaniem wykonać odpowiednią, swoistą dla badanej substancji chemicznej charakterystykę. Za pomocą metody grawimetrycznej można również określić stężenie wieloskładnikowego aerozolu proszkowego. Do tego jednak konieczne są dane analityczne, za pomocą których można wykazać, że skład materiału znajdującego się w powietrzu jest podobny do składu materiału wyjściowego. W razie braku takich informacji może być konieczna ponowna analiza badanej substancji chemicznej (najlepiej znajdującej się w powietrzu) w toku badania, w regularnych odstępach czasowych. W przypadku środków w formie aerozoli, które mogą ulec odparowaniu lub sublimacji, należy wykazać, że stosując wybraną metodę, zebrano wszystkie fazy. W sprawozdaniu z badania należy podać stężenia docelowe, nominalne i rzeczywiste, ale w analizach statystycznych do wyliczenia wartości stężeń śmiertelnych uwzględnia się tylko stężenia rzeczywiste.

21. Jeżeli to możliwe, należy używać badanej substancji chemicznej pochodzącej z jednej partii, a badaną próbkę należy przechowywać w warunkach zapewniających jej czystość, jednorodność i stabilność. Przed rozpoczęciem badania należy scharakteryzować badaną substancję chemiczną, w tym określić jej czystość oraz, o ile jest to wykonalne z technicznego punktu widzenia, nazwę oraz ilości zidentyfikowanych domieszek i zanieczyszczeń. Można to wykazać, między innymi, za pomocą następujących danych: czasu retencji i względnej powierzchni sygnału, masy cząsteczkowej uzyskanej w drodze spektrometrii masowej lub chromatografii gazowej bądź innych oszacowań. Mimo że identyfikacja badanej próbki nie należy do obowiązków laboratorium badawczego, rozsądne może być potwierdzenie przez to laboratorium charakterystyki, którą przedstawił sponsor, przynajmniej w ograniczonym zakresie (np. co do koloru, cech fizycznych itp.).

22. Podczas narażenia należy utrzymywać możliwie niezmienną atmosferę i monitorować ją stale lub co pewien czas, w zależności od metody analitycznej. Jeżeli stosuje się pobieranie próbek co pewien czas, podczas czterogodzinnego badania należy pobierać próbki powietrza w komorze nie rzadziej niż dwa razy podczas badania. Jeżeli z powodu ograniczonej prędkości przepływu powietrza lub niskich stężeń jest to niemożliwe, można pobrać jedną próbkę na cały okres narażenia. W razie wystąpienia znacznych fluktuacji pomiędzy próbkami dla kolejnych badanych stężeń należy pobrać cztery próbki na okres narażenia. Wartości stężeń w komorze dla poszczególnych próbek nie powinny odbiegać od stężenia średniego w komorze o więcej niż ± 10 % w przypadku gazów i par oraz o więcej niż ± 20 % w przypadku aerozoli ciekłych lub stałych. Należy obliczyć i zapisać okres wyrównania stężeń w komorze (t_{95}). Czas trwania narażenia obejmuje czas wprowadzania badanej substancji chemicznej do komory przy uwzględnieniu czasu potrzebnego do osiągnięcia t_{95}. Wytyczne dotyczące szacowania t_{95} można znaleźć w GD 39 (8).

▼M4

23. W przypadku bardzo złożonych mieszanin składających się z par/gazów i aerozoli (np. w przypadku atmosfer spalania i badanych substancji chemicznych wydzielanych ze specjalnych produktów/urządzeń do zastosowania końcowego) każda faza może zachowywać się inaczej w komorze inhalacyjnej, należy zatem wybrać co najmniej jedną substancję wskaźnikową (analit) z każdej fazy (para/gaz i aerozol) – zazwyczaj jest to główna substancja czynna mieszaniny. Jeżeli badana substancja chemiczna jest mieszaniną, należy podać stężenie analityczne w odniesieniu do całej mieszaniny, a nie tylko substancji czynnej lub składnika aktywnego (analitu). Dodatkowe informacje na temat stężeń rzeczywistych można znaleźć w GD 39 (8).

Badana substancja chemiczna: rozkład wielkości cząstek

24. Rozkład wielkości cząstek aerozoli należy określać co najmniej dwa razy podczas każdego czterogodzinnego okresu narażenia za pomocą impaktora kaskadowego lub innego instrumentu, takiego jak aerodynamiczny spektrometr pomiaru cząstek. Jeżeli można wykazać równoważność wyników uzyskanych za pośrednictwem impaktora kaskadowego lub innego instrumentu, to ten inny instrument może być stosowany przez cały okres badania. W celu potwierdzenia sprawności zatrzymywania cząstek przez instrument główny należy równolegle do tego instrumentu stosować drugie urządzenie, takie jak filtr grawimetryczny lub odpylacz/bełkotka. Stężenie masowe uzyskane na podstawie analizy wielkości cząstek powinno mieścić się w rozsądnych granicach stężenia masowego uzyskanego poprzez analizę filtrów [zob. GD 39 (8)]. Jeśli można wykazać równoważność w początkowej fazie badania, dalsze pomiary potwierdzające można pominąć. Ze względu na dobrostan zwierząt należy podjąć środki mające na celu zminimalizowanie ilości danych niejednoznacznych, które mogą prowadzić do konieczności powtórzenia narażenia. Klasyfikację cząstek według wielkości należy przeprowadzić w odniesieniu do par, jeżeli istnieje jakakolwiek możliwość tworzenia się aerozolu wskutek kondensacji par lub jeśli cząstki są wykrywane w atmosferze parowej mającej potencjał tworzenia faz mieszanych (zob. pkt 14).

PROCEDURA

Badanie główne

25. W każdym etapie wykorzystuje się trzy zwierzęta każdej płci lub sześć zwierząt płci bardziej podatnej na działanie substancji. Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu tylko przez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. Poziom stężenia do zastosowania w dawce wyjściowej wybiera się spośród jednego z czterech określonych poziomów i taki wyjściowy poziom stężenia powinien być poziomem, co do którego istnieje największe prawdopodobieństwo, że wywoła on toksyczność u niektórych ze zwierząt narażanych. Plany badania w przypadku gazów, par i aerozoli (przedstawione w dodatkach 2–4) przedstawiają badanie wartości granicznych dla kategorii z rozporządzenia CLP 1–4 (9) dla gazów (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (dodatek 2), dla par (0,5; 2; 10; 20 mg/l/4h) (dodatek 3) i dla aerozoli (0,05; 0,5; 1; 5 mg/l/4h) (dodatek 4). Kategoria 5, której nie wdrożono rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008 (9), dotyczy stężeń powyżej odpowiednich stężeń granicznych. Dla każdego stężenia wyjściowego stosuje się odpowiedni plan badania. W zależności od liczby zwierząt uśmierconych z powodów humanitarnych lub zwierząt padłych, procedurę badania przeprowadza się zgodnie ze wskazanymi strzałkami aż do etapu, na którym możliwe jest dokonanie kategoryzacji.

26. Odstępy czasowe między podawaniem dawek w każdej grupie poddawanej narażeniu określa się na podstawie czasu wystąpienia, długości trwania i ciężkości oznak toksyczności. Należy odwlec narażenie zwierząt przy kolejnym poziomie stężenia do momentu, gdy można w sposób uzasadniony uznać, że uprzednio badane zwierzęta przeżyły. Zaleca się przerwę długości trzech lub czterech dni między narażeniem z zastosowaniem kolejnych poziomów stężenia, w celu umożliwienia obserwacji opóźnionego działania toksycznego. Taki odstęp czasowy można odpowiednio dostosować, np. w przypadku niejednoznacznych reakcji.

▼M4

Badanie graniczne

27. Badanie graniczne stosuje się wtedy, gdy badana substancja chemiczna jest znana lub można się spodziewać, że jest ona praktycznie nietoksyczna, tj. powoduje efekt toksyczny dopiero powyżej stężenia granicznego przewidzianego przepisami. Informacje na temat toksyczności badanej substancji chemicznej można uzyskać na podstawie wiedzy na temat podobnych zbadanych substancji lub podobnych mieszanin, z uwzględnieniem nazwy i zawartości procentowej składników, o których wiadomo, że mają znaczenie z punktu widzenia toksyczności. W sytuacji niewystarczającej ilości lub braku informacji na temat toksyczności badanej substancji chemicznej lub w przypadku gdy oczekuje się, że taka substancja jest toksyczna, należy przeprowadzić badanie główne [dalsze wytyczne można znaleźć w GD 39 (8)].

28. W ramach normalnej procedury narażeniu poddaje się trzy zwierzęta każdej płci, lub sześć zwierząt płci bardziej podatnej na działanie substancji, przy stężeniach na poziomie odpowiednio 20 000 ppm w przypadku gazów, 20 mg/l w przypadku pary i 5 mg/l w przypadku pyłów/mgieł (jeśli jest to osiągalne), co stanowi badanie graniczne w ramach niniejszej metody badawczej. Przy badaniu aerozoli celem podstawowym powinno być osiągnięcie cząstek o respirabilnych rozmiarach (np. średnica aerodynamiczna mediany rozkładu masowego (MMAD) na poziomie 1-4 μm). Jest to możliwe w przypadku większości badanych substancji chemicznych przy stężeniu 2 mg/l. Badanie aerozoli przy stężeniu większym niż 2 mg/l należy przeprowadzać tylko wtedy, jeśli można osiągnąć rozmiar cząstek umożliwiający ich wdychanie [zob. GD 39 (8)]. Zgodnie z GHS (16) w trosce o dobrostan zwierząt odradza się badania przy stężeniu wyższym niż stężenie graniczne. Badanie w ramach kategorii GHS 5 (16), która nie jest wdrażana rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008 (9), należy brać pod uwagę tylko w przypadku znacznego prawdopodobieństwa, że wyniki takich badań przyniosą bezpośrednie korzyści dla ochrony zdrowia ludzi, a w sprawozdaniu z badania należy podać uzasadnienie. W przypadku badanych substancji chemicznych, które mogą spowodować wybuch, należy dołożyć starań w celu uniknięcia warunków sprzyjających wybuchowi. Aby uniknąć zbędnego wykorzystania zwierząt, należy przed badaniem granicznym przeprowadzić test próbny bez udziału zwierząt w celu upewnienia się, że warunki w komorze do przeprowadzenia badania granicznego są możliwe do osiągnięcia.

OBSERWACJE

29. Zwierzęta w trakcie okresu narażenia należy często poddawać obserwacji klinicznej. Po narażeniu należy prowadzić obserwacje kliniczne – w dniu narażenia co najmniej dwukrotnie, lub częściej, jeśli wskazuje na to reakcja zwierząt na poddawanie działaniu substancji, a po tym dniu co najmniej raz dziennie przez łącznie 14 dni. Długość okresu obserwacji nie jest określona, należy ją jednak ustalić na podstawie charakteru i czasu wystąpienia objawów klinicznych oraz długości okresu zdrowienia. Czas, w jakim pojawiają się i zanikają oznaki toksyczności, jest istotny, szczególnie w przypadku tendencji do występowania opóźnionych oznak toksyczności. Wszystkie obserwacje są systematycznie zapisywane w ewidencji prowadzonej osobno dla każdego zwierzęcia. Zwierzęta, u których stwierdzono stan agonalny, oraz zwierzęta wykazujące objawy silnego bólu lub stresu należy ze względu na ich dobrostan uśmiercić w sposób humanitarny. Przy badaniu pod kątem klinicznych oznak toksyczności należy zachować ostrożność, aby nie pomylić początkowego złego wyglądu i przejściowych zmian oddechowych, będących skutkiem procedury narażenia, ze skutkami związanymi z poddawaniem zwierząt działaniu badanej substancji chemicznej. Należy przestrzegać zasad i kryteriów streszczonych w wytycznych dotyczących humanitarnego punktu końcowego (7). W przypadku uśmiercenia zwierząt z przyczyn humanitarnych lub stwierdzenia ich zgonu należy możliwie najdokładniej zapisać czas zgonu.

▼M4

30. Obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować zmiany skóry i sierści, oczu i błon śluzowych; jak również zmiany w układzie oddechowym i układzie krążenia, zmiany w autonomicznym i ośrodkowym układzie nerwowym oraz zmiany w aktywności somatycznej i sposobie zachowania. O ile to możliwe, należy odnotować rozróżnienie pomiędzy skutkami miejscowymi i ogólnoustrojowymi. Szczególną uwagę należy poświęcić obserwacjom drżenia, konwulsji, ślinotoku, biegunki, letargu, snu i śpiączki. Pomiar temperatury w odbycie może dostarczyć dodatkowych dowodów potwierdzających odruchowe spowolnienie oddechu lub hipo-/hipertermię w związku z poddawaniem działaniu substancji lub przetrzymywaniem w zamknięciu.

Masa ciała

31. Należy odnotowywać masy ciała poszczególnych zwierząt: raz podczas okresu aklimatyzacji, w dniu narażenia przed narażeniem (dzień 0), oraz przynajmniej w dniach 1, 3 i 7 (a następnie co tydzień), jak również w momencie zgonu lub eutanazji, jeśli nastąpi ona później niż w dniu 1. Masę ciała uznaje się za krytyczny wskaźnik toksyczności, zatem zwierzęta wykazujące stały spadek wagi na poziomie ≥ 20 %, w porównaniu z wartościami przed badaniem, należy ściśle monitorować. Po zakończeniu okresu po narażeniu zwierzęta, które przeżyły, są ważone i humanitarnie uśmiercane.

Patologia

32. Wszystkie badane zwierzęta, w tym te, które padły podczas badań lub zostały poddane eutanazji i wyeliminowane z badań ze względu na ich dobrostan, należy poddać pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu. Jeżeli sekcji zwłok nie można przeprowadzić natychmiast po znalezieniu martwego zwierzęcia, zwierzę należy schłodzić (nie zamrozić) do temperatury wystarczająco niskiej do zminimalizowania autolizy. Sekcję zwłok należy przeprowadzić możliwie szybko, zwykle w ciągu jednego lub dwóch dni. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy odnotować wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne ze szczególnym uwzględnieniem wszelkich zmian w drogach oddechowych.

33. Można rozważyć przeprowadzenie dodatkowych, uprzednio zaprojektowanych testów w celu zwiększenia wartości interpretacyjnej badania, np. pomiaru masy płuc u szczurów, które przeżyły, czy dostarczenia dowodów na podrażnienie poprzez badanie dróg oddechowych pod mikroskopem. Można również objąć badaniem organy wykazujące wyraźne zmiany patologiczne u zwierząt, które przeżyły 24 lub więcej godzin, oraz organy, co do których wiadomo lub można oczekiwać, że narażenie miało na nie wpływ. Z mikroskopowego badania całych dróg oddechowych można uzyskać użyteczne informacje na temat badanych substancji chemicznych, które reagują z wodą, takich jak kwasy i badane substancje chemiczne o właściwościach higroskopijnych.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

34. Należy podać dane dotyczące masy ciała i wyników sekcji zwłok dotyczące poszczególnych zwierząt. Dane z obserwacji klinicznych należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę wykorzystanych zwierząt, liczbę zwierząt wykazujących specyficzne oznaki toksyczności, liczbę zwierząt padłych w trakcie trwania badania lub uśmierconych z przyczyn humanitarnych, czas zgonu poszczególnych zwierząt, opis skutków toksycznych oraz ich przebieg w czasie i odwracalność, a także wyniki sekcji zwłok.

▼M4

Sprawozdanie z badania

35. Sprawozdanie z badania powinno w stosownych przypadkach zawierać następujące informacje:

Badane zwierzęta i ich hodowla

— opis warunków przetrzymywania w klatkach, w tym: liczba (lub zmiana liczby) zwierząt na klatkę, ściółka, temperatura otoczenia i wilgotność względna, fotoperiod i określenie diety,

— wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie zastosowania gatunków innych niż szczur,

— liczba, wiek i płeć zwierząt,

— metoda randomizacji,

— szczegółowe informacje na temat jakości pożywienia i wody (w tym rodzaj/źródło diety oraz źródło wody),

— opis wszelkich przygotowań przed badaniem, w tym diety, kwarantanny i leczenia chorób.

Badana substancja chemiczna

— cechy fizyczne, czystość oraz w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (w tym izomeryzacja),

— dane identyfikacyjne i numer w rejestrze Chemical Abstract Services (CAS), jeżeli jest znany.

Nośnik

— uzasadnienie zastosowania nośnika oraz uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda),

— dane historyczne lub równoległe wykazujące, że nośnik nie zakłóca wyniku badania.

Komora inhalacyjna

— szczegółowy opis komory inhalacyjnej, w tym jej rozmiary i objętość,

— źródło i opis wyposażenia wykorzystywanego do celów narażenia zwierząt, jak również do wytwarzania atmosfery,

— wyposażenie do pomiaru temperatury, wilgotności, wielkości cząstek i stężenia rzeczywistego,

— źródło powietrza, metoda oczyszczania dostarczanego/pobieranego powietrza oraz system klimatyzacji,

— metody kalibracji wyposażenia w celu zapewnienia jednorodnej atmosfery na potrzeby badania,

— różnica ciśnienia (dodatnia lub ujemna),

— porty narażenia w komorze (narażenie tylko przez nos); lokalizacja zwierząt w układzie (narażenie całego ciała),

— jednorodność/stabilność w czasie atmosfery na potrzeby badania,

— lokalizacja czujników temperatury i wilgotności oraz pobieranie próbek powietrza w komorze,

— natężenie przepływu powietrza, natężenie przepływu powietrza/port narażenia (narażenie tylko przez nos) lub ładunek zwierząt/komorę (narażenie całego ciała),

— informacje na temat wyposażenia stosowanego do pomiaru zawartości tlenu i dwutlenku węgla, w stosownych przypadkach,

▼M4

— czas potrzebny do wyrównania stężeń w komorze inhalacyjnej (t_{95}),

— liczba zmian objętości na godzinę,

— urządzenia pomiarowe (w stosownych przypadkach).

Dane ekspozycji

— uzasadnienie wyboru docelowego stężenia w badaniu głównym,

— stężenia nominalne (całkowita masa badanej substancji chemicznej wprowadzonej do komory inhalacyjnej podzielona przez objętość powietrza przepuszczonego przez komorę),

— rzeczywiste stężenia badanej substancji chemicznej w próbkach ze strefy oddychania zwierząt; w przypadku mieszanin, które tworzą heterogeniczne formy fizyczne (gazy, pary, aerozole), każdą substancję można analizować oddzielnie,

— wszystkie stężenia substancji w powietrzu należy podawać w jednostkach masy (np. mg/l, mg/m^3 itp.), w nawiasie można podać również jednostki objętości (np. ppm, ppb itp.),

— rozkład wielkości cząstek, średnica aerodynamiczna mediany rozkładu masowego (MMAD) oraz geometryczne odchylenie standardowe (σ_g), w tym metody ich obliczania. Należy odnotować poszczególne analizy wielkości cząstek.

Warunki badania

— szczegółowe informacje na temat przygotowania badanej substancji chemicznej, w tym szczegóły dotyczące wszelkich procedur zastosowanych w celu zmniejszenia rozmiaru cząstek substancji stałych lub przygotowania roztworów badanej substancji chemicznej. W przypadkach gdy procesy mechaniczne mogły wpłynąć na zmianę składu badanej substancji chemicznej, należy zamieścić wyniki analiz mających na celu weryfikację składu badanej substancji chemicznej,

— opis (najlepiej wraz ze schematem) wyposażenia wykorzystywanego do wytworzenia atmosfery na potrzeby badania i narażania zwierząt na jej działanie,

— szczegółowe informacje na temat zastosowanej metody analizy chemicznej oraz walidacji metody (w tym wydajność odzysku badanej substancji chemicznej ze środka do pobierania próbek),

— uzasadnienie wyboru badanych stężeń.

Wyniki

— tabelaryczne zestawienie temperatury, wilgotności i przepływu powietrza w komorze,

— tabelaryczne zestawienie danych dotyczących nominalnego i rzeczywistego stężenia w komorze,

— tabelaryczne zestawienie danych dotyczących wielkości cząstek, w tym danych dotyczących gromadzenia próbek analitycznych, zróżnicowania wielkości cząstek oraz obliczenia średnicy aerodynamicznej mediany rozkładu masowego (MMAD) i σ_g,

— tabelaryczne zestawienie danych dotyczących reakcji i poziomu stężenia dla każdego zwierzęcia (tj. zwierząt wykazujących oznaki toksyczności, w tym śmiertelność, rodzaj, ostrość, czas pojawienia się i czas trwania objawów),

— masy ciała poszczególnych zwierząt zarejestrowane w trakcie badania, data i godzina zgonu, jeśli nastąpił przed planową eutanazją; przebieg w czasie oznak toksyczności i informacje, czy były one odwracalne w przypadku każdego zwierzęcia,

▼M4

— wyniki sekcji zwłok oraz badań histopatologicznych w odniesieniu do każdego zwierzęcia, jeżeli są dostępne,

— klasyfikacja kategorii według rozporządzenia CLP oraz wartość graniczna LC_{50}.

Omówienie i interpretacja wyników

— szczególny nacisk należy położyć na opis metod zastosowanych w celu spełnienia kryteriów niniejszej metody badawczej, np. dotyczących stężenia granicznego lub rozmiaru cząstek,

— należy uwzględnić respirabilność cząstek w świetle wyników ogólnych, szczególnie jeżeli nie można było spełnić kryterium wielkości cząstek,

— w ogólnej ocenie badania należy uwzględnić spójność metod zastosowanych w celu określenia nominalnego i rzeczywistego stężenia oraz relacji między stężeniem rzeczywistym a nominalnym,

— należy uwzględnić prawdopodobną przyczynę zgonu i dominujący sposób działania (ogólnoustrojowy w porównaniu z miejscowym),

— należy przedstawić wyjaśnienie, jeżeli zaistniała konieczność humanitarnego uśmiercenia zwierząt wykazujących oznaki bólu lub objawy ostrego i przewlekłego stresu, zgodnie z kryteriami zawartymi w wytycznych OECD dotyczących humanitarnego punktu końcowego (7).

BIBLIOGRAFIA:

(1) Rozdział B.2 niniejszego załącznika. Toksyczność ostra (inhalacyjna).

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W i 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 i Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. Arch. Toxicol. 71: 537–549.

(4) Diener W i Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 1: 129–134.

(5) Rozdział B.1 tris niniejszego załącznika. Ostra toksyczność doustna – metoda klas ostrej toksyczności.

(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 nr 105, OECD, Paryż. Tekst dostępny pod adresem: [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 nr 19.Tekst dostępny pod adresem: [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 nr 39, OECD, Paryż. Tekst dostępny pod adresem: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1).

▼**M4**

(10) Rozdział B.40 niniejszego załącznika. Badanie niszczenia skóry metodą *in vitro*: test przezskórnego oporu elektrycznego (TER).

(11) Rozdział B.40 bis niniejszego załącznika. Badanie zniszczenia skóry metodą *in vitro*: badanie modelu skóry ludzkiej.

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals nr 435, OECD, Paryż. Tekst dostępny pod adresem: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2 wydanie) Informa Healthcare, Nowy Jork.

(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 i Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167

(16) ONZ (2007), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) ONZ, ST/SG/AC.10/30, ONZ Nowy Jork i Genewa. Tekst dostępny pod adresem: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICJA

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M4

Dodatek 2

Procedura, jaką należy zastosować przy każdym z wyjściowych stężeń w przypadku gazów (ppm/4h)

Uwagi ogólne ([1])

Dla każdego stężenia wyjściowego odpowiednie plany badań zawarte w niniejszym dodatku przedstawiają procedurę, jaką należy zastosować.

Dodatek 2a: Stężenie wyjściowe wynosi 100 ppm

Dodatek 2b: Stężenie wyjściowe wynosi 500 ppm

Dodatek 2c: Stężenie wyjściowe wynosi 2 500 ppm

Dodatek 2d: Stężenie wyjściowe wynosi 20 000 ppm

W zależności od liczby zwierząt uśmierconych z powodów humanitarnych lub zwierząt padłych procedurę badania przeprowadza się zgodnie ze wskazanymi strzałkami.

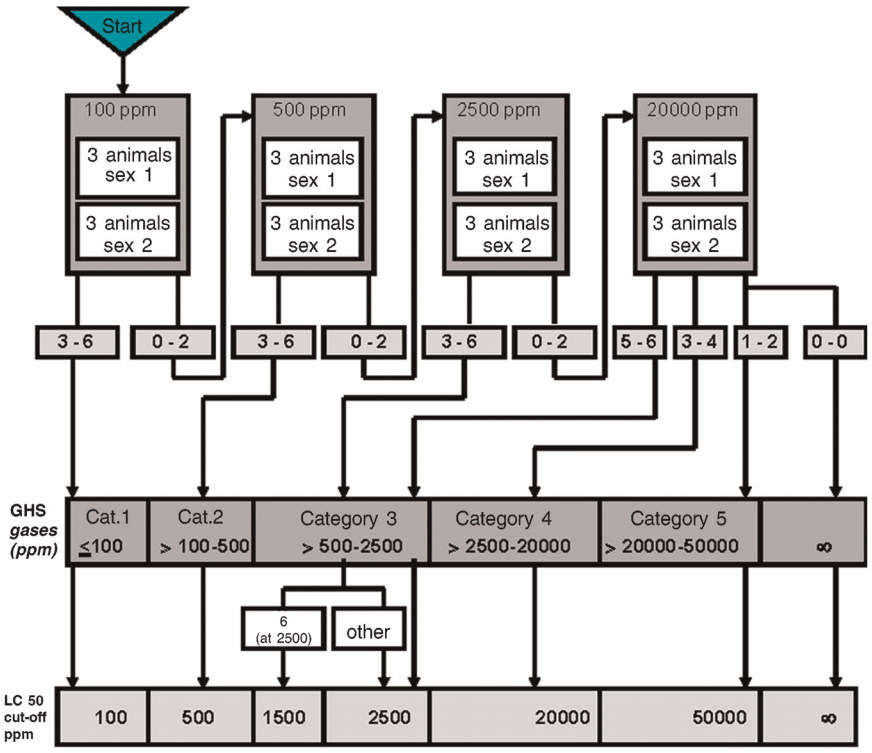
([1]) Poniższe tabele odnoszą się do Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). Jego odpowiednikiem na poziomie UE jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008. W przypadku ostrej toksyczności inhalacyjnej rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 (9) nie wdraża kategorii 5.

▼M4

Dodatek 2a

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 100 ppm/4 h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

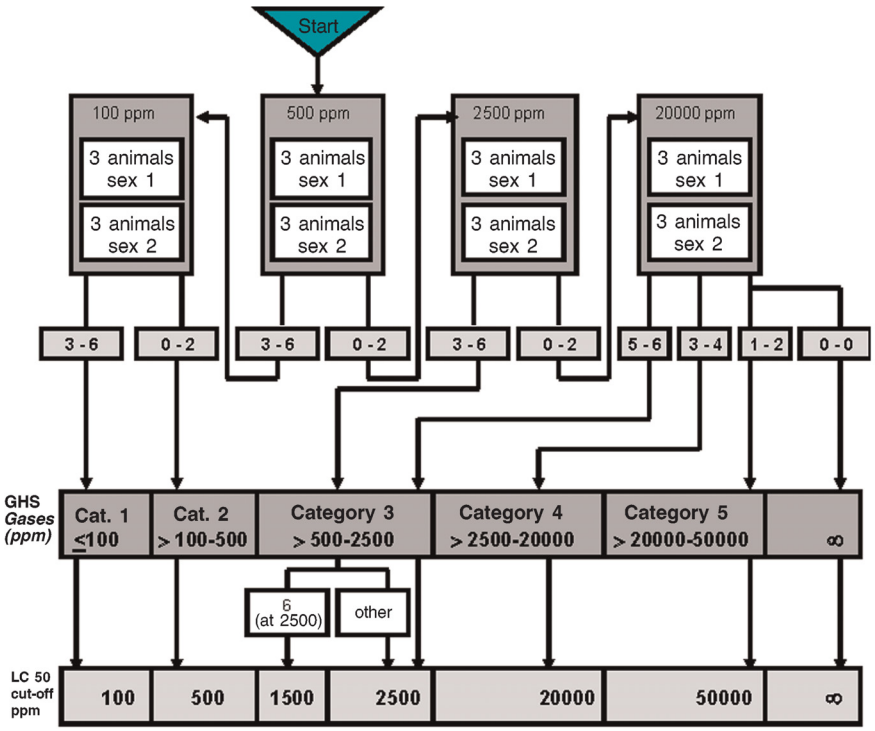
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatek 2b

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

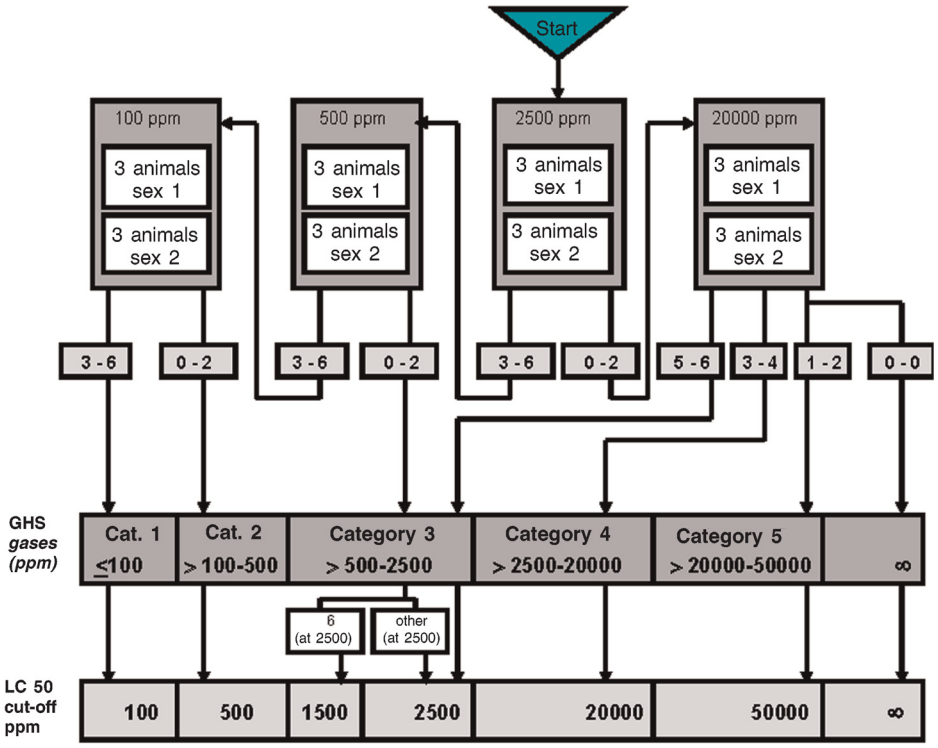
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatek 2c

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 2 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

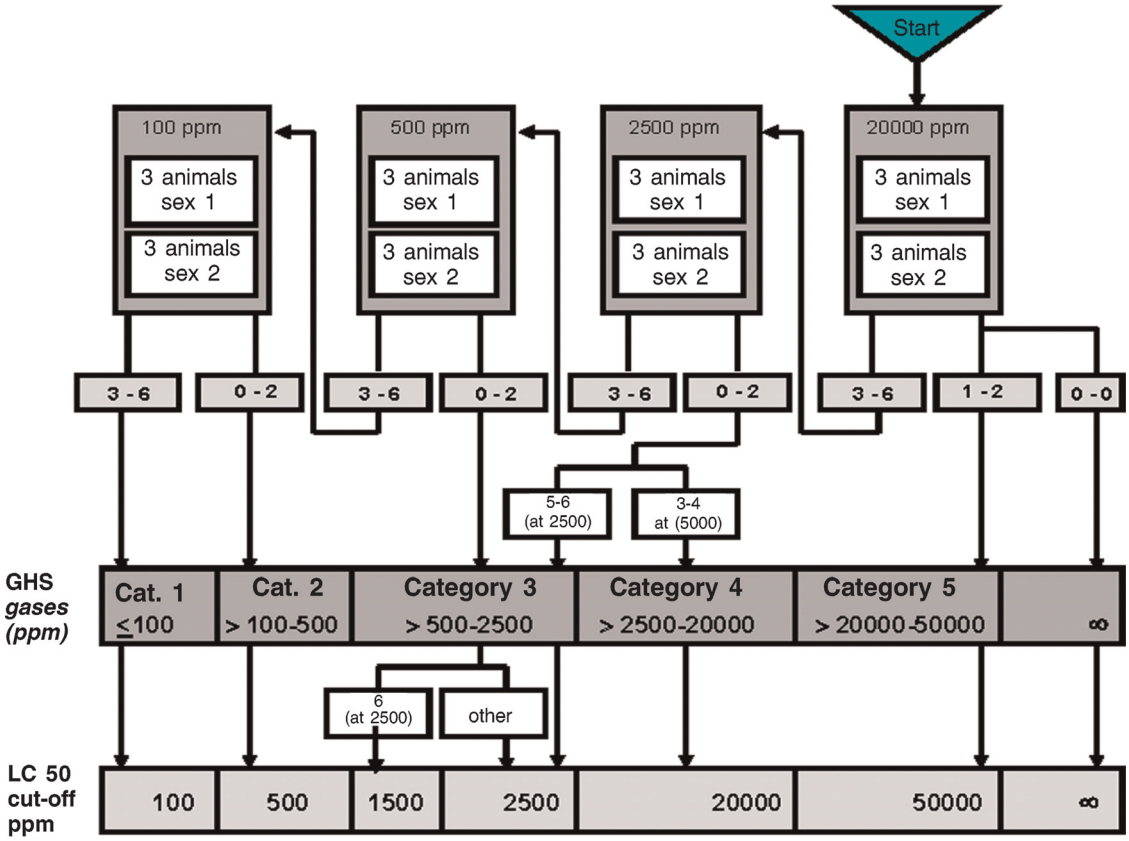
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatek 2d

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 20 000 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼**M4**

Dodatek 3

Procedura, jaką należy zastosować przy każdym z wyjściowych stężeń w przypadku par (mg/l/4h)

Uwagi ogólne ([1])

Dla każdego stężenia wyjściowego odpowiednie plany badań zawarte w niniejszym dodatku przedstawiają procedurę, jaką należy zastosować.

Dodatek 3a: Stężenie wyjściowe wynosi 0,5 mg/l

Dodatek 3b: Stężenie wyjściowe wynosi 2,0 mg/l

Dodatek 3c: Stężenie wyjściowe wynosi 10 mg/l

Dodatek 3d: Stężenie wyjściowe wynosi 20 mg/l

W zależności od liczby zwierząt uśmierconych z powodów humanitarnych lub zwierząt padłych procedurę badania przeprowadza się zgodnie ze wskazanymi strzałkami.

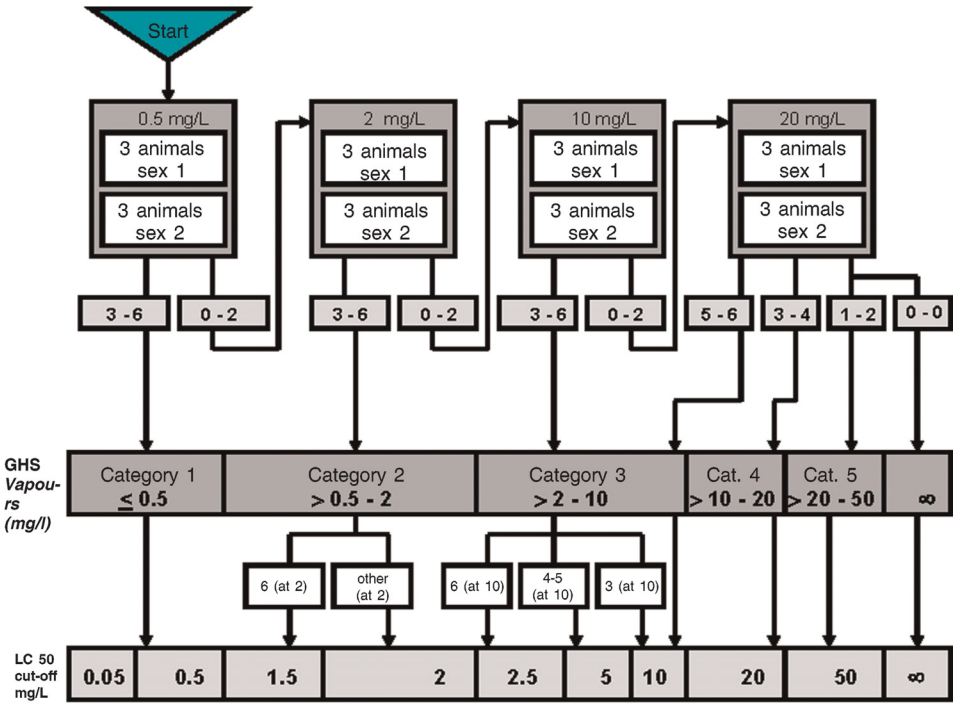
([1]) Poniższe tabele odnoszą się do Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). Jego odpowiednikiem na poziomie UE jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008. W przypadku ostrej toksyczności inhalacyjnej rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 (9) nie wdraża kategorii 5.

▼M4

Dodatek 3a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.5 mg/L/4h for vapours



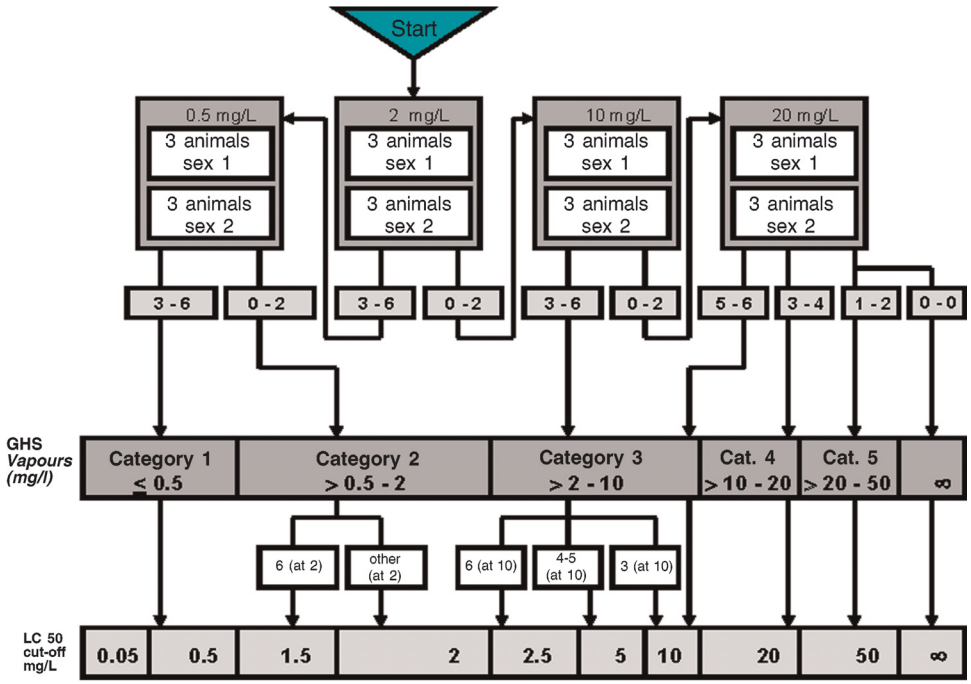
- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatek 3b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 2 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

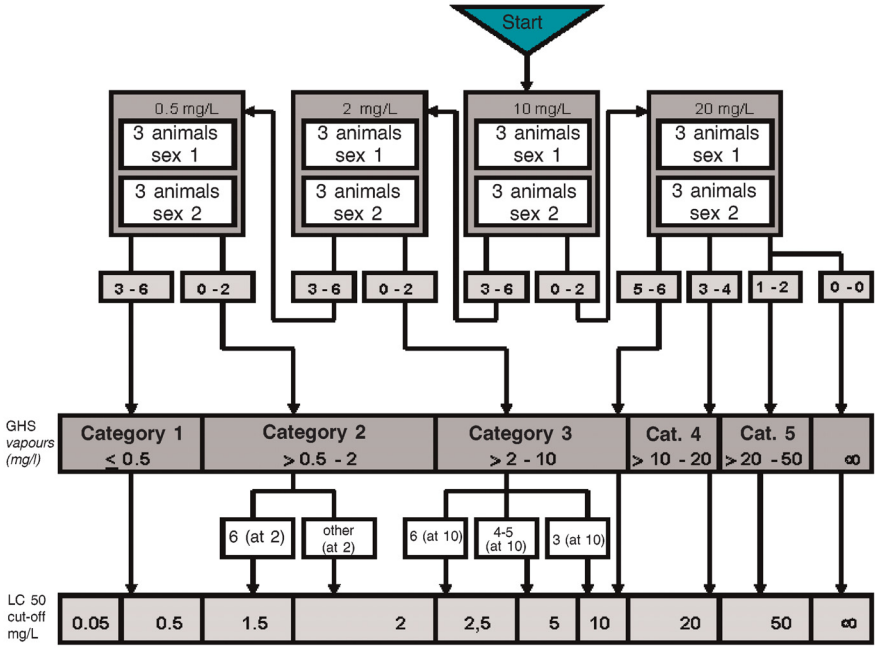
— Testing at 50 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatek 3c

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 10 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used pers step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

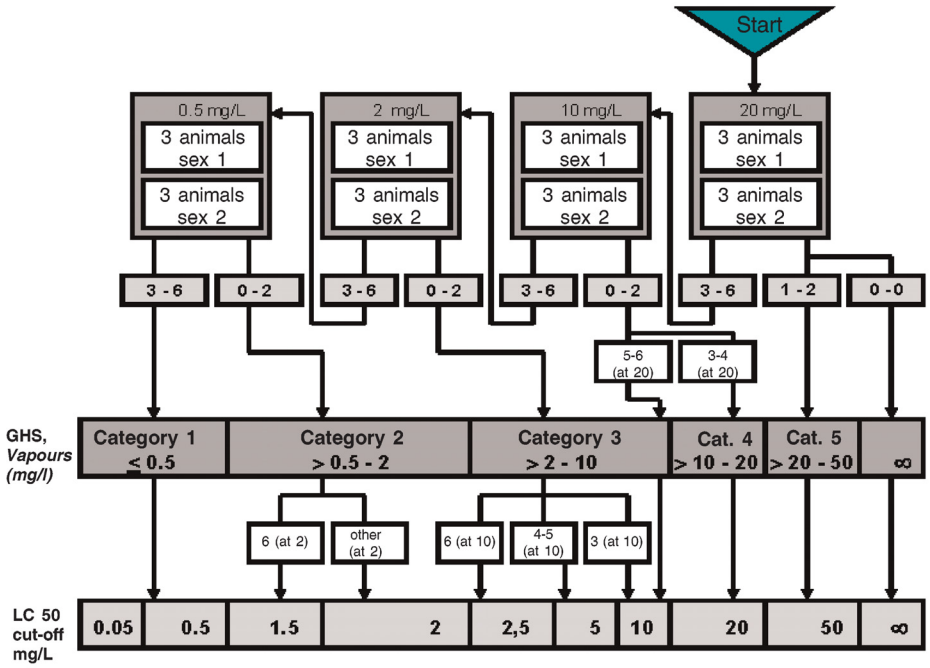
— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatek 3d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39(8)

▼M4

Dodatek 4

Procedura, jaką należy zastosować przy każdym z wyjściowych stężeń w przypadku aerozoli (mg/l/4h)

Uwagi ogólne ([1])

Dla każdego stężenia wyjściowego odpowiednie plany badań zawarte w niniejszym dodatku przedstawiają procedurę, jaką należy zastosować.

Dodatek 4a: Stężenie wyjściowe wynosi 0,05 mg/l

Dodatek 4b: Stężenie wyjściowe wynosi 0,5 mg/l

Dodatek 4c: Stężenie wyjściowe wynosi 1 mg/l

Dodatek 4d: Stężenie wyjściowe wynosi 5 mg/l

W zależności od liczby zwierząt uśmierconych w sposób humanitarny lub martwych zwierząt procedura badań przebiega zgodnie z kierunkiem wyznaczanym przez strzałki.

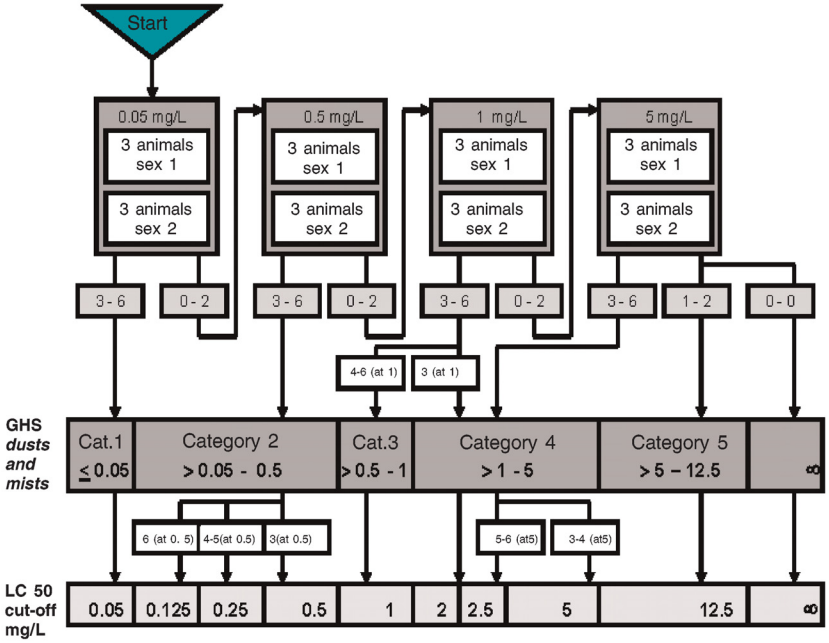
([1]) Poniższe tabele odnoszą się do Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). Jego odpowiednikiem na poziomie UE jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008. W przypadku ostrej toksyczności inhalacyjnej rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 (9) nie wdraża kategorii 5.

▼M4

Dodatek 4a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.05 mg/L/4h for vapours



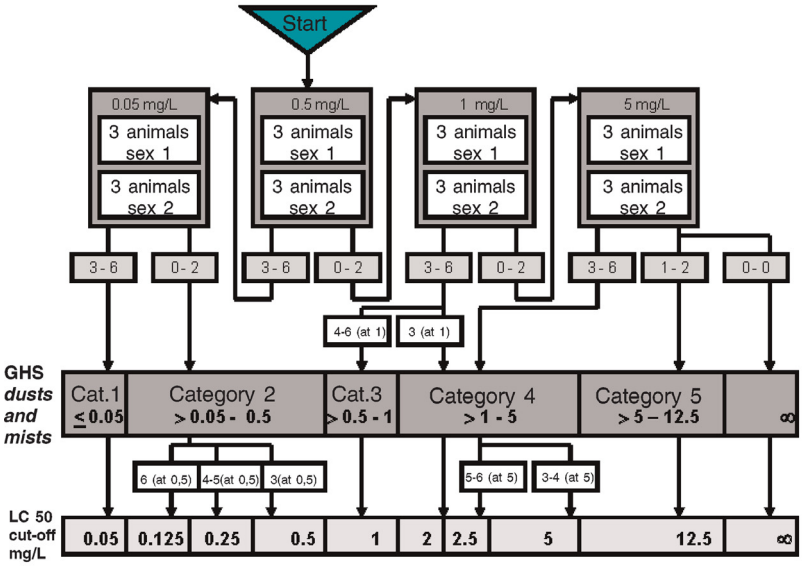
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatek 4b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.5 mg/L/4h for aerosols



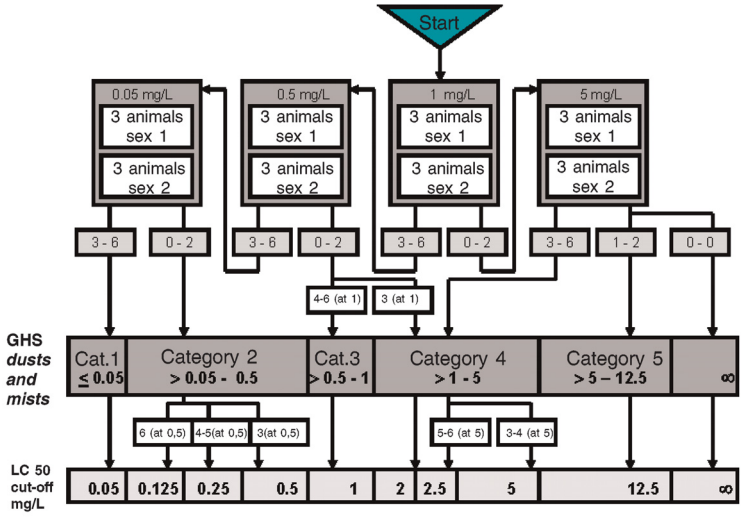
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatek 4c

Acute inhalation toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 1 mg/L/4h for aerosols



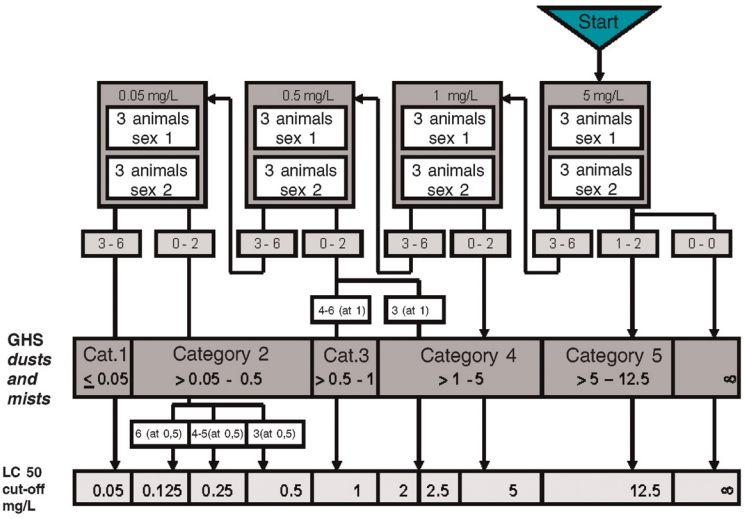
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatek 4d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6 : Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)”

▼M5

B.53. **BADANIE NEUROTOKSYCZNOŚCI ROZWOJOWEJ**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest zgodna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 426 (2007 r.). W czerwcu 1995 r. w Kopenhadze grupa robocza OECD ds. toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej omawiała potrzebę aktualizacji istniejących wytycznych OECD dotyczących badań w zakresie toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej oraz opracowania nowych wytycznych w odniesieniu do punktów końcowych, których jeszcze nie uwzględniono (1). Grupa robocza zaleciła opracowanie dotyczącej badań wytycznej w zakresie neurotoksyczności rozwojowej na podstawie wytycznej amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska, która została już poprawiona (2). W czerwcu 1996 r. w Kopenhadze odbyło się drugie spotkanie konsultacyjne, którego celem było dostarczenie Sekretariatowi wskazówek dotyczących konspektu nowej dotyczącej badań wytycznej w zakresie neurotoksyczności rozwojowej, w tym jej najbardziej istotnych elementów, np. szczegółów dotyczących doboru gatunków zwierząt, okresu dawkowania, okresu badania, punktów końcowych podlegających ocenie i kryteriów oceny wyników. Amerykańska wytyczna dotycząca oceny ryzyka neurotoksyczności została opublikowana w 1998 r. (3). Spotkanie konsultacyjne ekspertów OECD i warsztaty prowadzone przez Risk Science Institute przy ILSI odbyły się równolegle w październiku 2000 r., a spotkanie konsultacyjne ekspertów odbyło się w Tokio w 2005 r. Spotkania te miały na celu omówienie kwestii naukowych i technicznych związanych z aktualnymi wytycznymi dotyczącymi badań, a zalecenia, które były ich wynikiem (4)(5)(6)(7), uwzględniono w opracowaniu przedmiotowej metody badawczej. Dodatkowe informacje dotyczące procedury, interpretacji i terminologii stosowanej w przypadku tej metody badawczej można znaleźć w dokumencie zawierającym wytyczne OECD nr 43 ‘Reproductive Toxicity Testing and Assessment’ (Badanie i ocena toksyczności reprodukcyjnej) (8) oraz nr 20 ‘Neurotoxicity Testing’ (Badanie neurotoksyczności) (9).

USTALENIA WSTĘPNE

2. Znany jest szereg substancji chemicznych, które prowadzą do neurotoksyczności rozwojowej u ludzi i innych gatunków (10)(11)(12)(13). Określenie potencjału wywoływania neurotoksyczności rozwojowej może być niezbędne do oceny i zbadania toksycznych cech charakterystycznych substancji chemicznej. Badania neurotoksyczności rozwojowej mają na celu dostarczanie danych, w tym charakterystyki dawka-odpowiedź, dotyczących potencjalnych skutków czynnościowych i morfologicznych dla rozwijającego się układu nerwowego potomstwa, które mogą powstać w wyniku narażenia *in utero* i we wczesnym stadium życia.

3. Badanie neurotoksyczności rozwojowej można prowadzać jako oddzielne badanie włączone do badania toksyczności reprodukcyjnej lub badania neurotoksyczności u dorosłych osobników (np. metody badawcze B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)), lub w powiązaniu z badaniem przedurodzeniowej toksyczności rozwojowej (np. z metodą badawczą B.31 (17)). Jeżeli badanie neurotoksyczności rozwojowej jest włączone do innego badania lub z nim powiązane, konieczne jest zachowanie integralności obu rodzajów badań. Wszystkie badania powinny być zgodne z mającymi zastosowanie przepisami lub wytycznymi rządowymi i instytucjonalnymi, dotyczącymi wykorzystywania zwierząt doświadczalnych w badaniach (np. 18).

4. Laboratorium badawcze powinno uwzględnić wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej przed przystąpieniem do badania. Informacje te powinny obejmować tożsamość i strukturę chemiczną substancji, jej właściwości fizykochemiczne; wyniki wszystkich innych badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo* przeprowadzonych na substancji, dane toksykologiczne substancji chemicznych zbliżonych pod względem budowy oraz przewidywane zastosowanie (zastosowania) tej substancji. Informacje te są niezbędne dla przekonania wszystkich zainteresowanych stron, że badanie dotyczy ochrony zdrowia ludzi i jest pomocne w wyborze odpowiedniej dawki wyjściowej.

▼M5

ZASADA BADANIA

5. Badaną substancję chemiczną podaje się zwierzętom przez okres ciąży i laktacji. Badania prowadzi się na matkach, aby ocenić skutki dla samic w okresie ciąży i laktacji oraz aby mieć możliwość uzyskania informacji porównawczych (matki w porównaniu z potomstwem). Do oceny neurotoksyczności potomstwo dobiera się losowo z miotu. Ocena polega na obserwacji mającej na celu wykrycie poważnych anomalii neurologicznych i behawioralnych, w tym na ocenie rozwoju fizycznego, rozwoju zachowań, aktywności ruchowej, funkcji motoryczno-sensorycznych, uczenia się i pamięci, ocenie mas mózgów i ocenie neuropatologicznej w okresie rozwoju pourodzeniowego i dorosłości.

6. Jeżeli metodę badawczą stosuje się jako odrębne badanie, można wykorzystać dodatkowe, dostępne zwierzęta z każdej grupy w celu przeprowadzenia szczegółowych procedur neurobehawioralnych, neuropatologicznych, neurochemicznych lub elektrofizjologicznych, które mogą uzupełnić dane otrzymane w badaniach zalecanych w ramach niniejszej metody (16)(19)(20)(21). Procedury uzupełniające mogą być szczególnie użyteczne w przypadkach, gdy obserwacje empiryczne, przewidywane skutki lub mechanizm/sposób działania wskazują na jakiś szczególny rodzaj neurotoksyczności. Te procedury uzupełniające można stosować zarówno w przypadku matek, jak i młodych. Ponadto można również stosować procedury *ex vivo* lub *in vitro*, o ile nie zmienią one integralności procedur *in vivo*.

PRZYGOTOWANIA DO BADANIA

Wybór gatunków zwierząt

7. Badania najlepiej jest przeprowadzać na szczurach; w stosownych przypadkach można wykorzystać inne gatunki. Należy jednak pamiętać, że liczba dni ciąży i liczba dni okresu postnatalnego określone w tej metodzie są charakterystyczne dla powszechnie stosowanych szczepów szczurów i w związku z tym należy dobrać porównywalne liczby dni w przypadku wykorzystania innego gatunku lub nietypowego szczepu. Należy uzasadnić wykorzystanie innego gatunku na podstawie danych toksykologicznych, farmakokinetycznych lub innych. Uzasadnienie powinno obejmować dostępne, określone dla gatunku oceny neurobehawioralne i neuropatologiczne przeprowadzone w okresie pourodzeniowym. Jeżeli wcześniej miało miejsce badanie, które wzbudziło zaniepokojenie, należy uwzględnić gatunek/szczep, w odniesieniu do którego miało to miejsce. Ze względu na zróżnicowane, związane z badaniami cechy różnych szczepów szczurów powinien istnieć dowód, że wybrany do badania szczep charakteryzuje się odpowiednią płodnością i zdolnością reagowania. Należy udokumentować wiarygodność i czułość innych gatunków pod względem wykrywania neurotoksyczności rozwojowej.

Warunki trzymania i żywienia

8. Temperatura w badawczych pomieszczeniach hodowlanych powinna wynosić 22 ± 3 °C. Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i najlepiej byłoby, gdyby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, docelowy poziom wilgotności powinien wynosić 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu dziennym 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Możliwe jest również odwrócenie cyklu światła przed kryciem i na okres trwania badania w celu przeprowadzenia oceny funkcjonalnych i behawioralnych punktów końcowych w fazie nocy (przy oświetleniu czerwonym światłem), tj. w czasie, gdy zwierzęta są zwykle aktywne (22). Wszelkie zmiany w cyklu dzień/noc powinny uwzględniać odpowiedni czas aklimatyzacji aby zwierzęta mogły przystosować się do nowego cyklu. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Należy zgłosić rodzaj pokarmu i wodę i przebadać je pod kątem zanieczyszczeń.

▼M5

9. Zwierzęta mogą być trzymane pojedynczo lub umieszczane w klatkach w małych grupach o tej samej płci. Procedury krycia powinny być przeprowadzane w klatkach nadających się do tego celu. Po stwierdzeniu, że kopulacja nastąpiła, lub nie później niż w 15 dniu ciąży, pokryte zwierzęta powinny być umieszczone oddzielnie w klatkach porodowych lub matczynych. Klatki powinny być ustawione w taki sposób, żeby zminimalizować możliwy wpływ położenia klatki. Tuż przed porodem należy zapewnić pokrytym samicom właściwe i określone materiały do budowy gniazda. Wiadomo powszechnie, że nieodpowiednie obchodzenie się ze zwierzęciem lub stres w czasie ciąży mogą pociągać za sobą niepożądane skutki, w tym straty przedurodzeniowe, wadliwy rozwój płodu i wadliwy rozwój pourodzeniowy. W celu ochrony przed stratą płodu spowodowaną czynnikami niezwiązanymi z doświadczeniem należy ostrożnie postępować ze zwierzętami w czasie ciąży i chronić je przed stresem wywoływanym czynnikami zewnętrznymi, takimi jak nadmierny hałas na zewnątrz.

Przygotowanie zwierząt

10. Należy wykorzystywać zdrowe zwierzęta zaaklimatyzowane do warunków laboratoryjnych i niepoddawane wcześniej procedurom doświadczalnym, chyba że badanie zostało włączone do innego badania (zob. pkt 3). Należy sporządzić charakterystykę badanych zwierząt pod kątem gatunku, szczepu, źródła pochodzenia, płci, wagi i wieku. Każdemu zwierzęciu należy nadać niepowtarzalny numer identyfikacyjny i oznaczyć je tym numerem. Na tyle, na ile to możliwe, we wszystkich badanych grupach zwierzęta powinny mieć jednakową masę ciała i być w tym samym wieku oraz mieścić się w zakresach typowych dla gatunku lub szczepu objętego badaniem. Do każdej dawki należy wykorzystać młode dojrzałe samice nieródki. Nie należy wykorzystywać rodzeństwa do krycia i należy dołożyć wszelki starań, aby to zapewnić. Dzień 0 danej ciąży jest dniem, w którym odnotowuje się czop pochwowy lub plemniki w pochwie. Po zakupie od dostawcy zapłodnionych w znanym czasie zwierząt należy dać im odpowiedni czas na aklimatyzację (np. 2–3 dni). Pokryte samice należy przydzielić w sposób losowy do grup kontrolnych i grup eksperymentalnych i, o ile to możliwe, rozdzielić je równomiernie między grupy (np. zaleca się procedurę warstwowego doboru losowego w celu zapewnienia równomiernego rozłożenia zwierząt między wszystkie grupy, np. na podstawie masy ciała). Samice inseminowane przez tego samego samca powinny być rozdzielone równomiernie między grupy.

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

11. Każda grupa badana i kontrolna powinna składać się z wystarczającej liczby ciężarnych samic, które mają być poddane działaniu badanej substancji chemicznej, aby uzyskać odpowiednią liczbę potomstwa do oceny neurotoksyczności. W odniesieniu do każdego poziomu dawki zaleca się wykorzystanie łącznie 20 miotów. Dopuszcza się schematy dawkowania powtarzanego i etapowego w odniesieniu do grupy, w przypadkach gdy udaje się uzyskać całkowitą liczbę miotów na grupę i stosuje się odpowiednie modele statystyczne, na podstawie których określa się powtórzenia.

12. W dniu 4. po urodzeniu lub przed nim (dzień porodu jest dniem 0) liczebność każdego miotu powinna zostać dostosowana przez wyeliminowanie dodatkowych młodych w miocie za pomocą doboru losowego, aby uzyskać jednakową liczebność wszystkich miotów (23). Liczebność miotu nie powinna przekraczać średniej liczebności miotu wykorzystanego szczepu gryzoni (8–12). Miot powinien się składać, w miarę możliwości, z takiej samej liczby młodych samców i samic. Selektywna eliminacja młodych, np. oparta na masie ciała, jest nieodpowiednia. Po dokonaniu standaryzacji miotów (eliminacji) i przed dalszymi badaniami funkcjonalnych punktów końcowych należy zidentyfikować w sposób niepowtarzalny poszczególne młode, które wybrano do badań przedodsadzeniowych lub poodsadzeniowych, za pomocą dowolnej odpowiedniej humanitarnej metody przeznaczonej do identyfikacji młodych (np. 24).

▼M5

Wyznaczanie zwierząt do obserwacji funkcjonalnych i behawioralnych, ocen mas mózgów i ocen neuropatologicznych

13. W opisywanej metodzie badawczej dopuszcza się różne podejścia w odniesieniu do wyznaczania zwierząt, które są poddawane działaniu *in utero* i w okresie laktacji, do obserwacji funkcjonalnych i behawioralnych, oceny dojrzałości płciowej, pomiaru masy mózgu i oceny neuropatologicznej (25). Indywidualnie w odniesieniu do każdego przypadku można dodać inne badania funkcji neurobehawioralnej (np. zachowań społecznych), zmian neurochemicznych lub neuropatologicznych, dopóki nie będzie to zagrażać integralności pierwotnie wymaganych badań.

14. Młode dobiera się z każdej grupy dawkowania i przydziela pod kątem ocen punktów końcowych w dniu 4. po urodzeniu lub później. Dobór młodych należy przeprowadzić w taki sposób, aby, na ile to możliwe, obie płcie z każdego miotu w każdej grupie dawkowania były reprezentowane we wszystkich badaniach w jednakowym stopniu. W celu zbadania aktywności ruchowej należy przeprowadzić badanie na tej samej parze młodych, samca i samicy, na wszystkich etapach wiekowych przed odsadzeniem (zob. pkt 35). Do celów wszystkich innych badań można przydzielić te same lub inne pary samców i samic do różnych badań behawioralnych. Może być wymagane przydzielenie różnych młodych do badań funkcji poznawczych w okresie po odsadzeniu lub w okresie dojrzałości, aby nie dopuścić do pomylenia z wpływem wieku i wcześniejszych szkoleń na te pomiary (26)(27). Przy odsadzaniu (dzień 21. po urodzeniu) można humanitarnie uśmiercić młode, których nie wybrano do badań. Należy odnotować wszelkie zmiany w przydziałach młodych. Statystyczną jednostką miary powinien być miot (lub matka), a nie młode.

15. Istnieją różne sposoby przydzielania młodych do badań przedodsadzeniowych i poodsadzeniowych, badań funkcji poznawczych, badań patologicznych itp. (zob. rys. 1 w odniesieniu do ogólnego schematu i dodatek 1 w odniesieniu do przykładów przydzielania). Zalecana minimalna liczba zwierząt w każdej grupie dawkowania w odniesieniu do badań przedodsadzeniowych i poodsadzeniowych jest następująca:

obserwacje kliniczne i masa ciała	wszystkie zwierzęta
szczegółowe obserwacje kliniczne	20/płeć (1/płeć/miot)
masa mózgu (po utrwalaniu) między dniem 11. a 22. po urodzeniu	10/płeć (1/miot)
masa mózgu (nieutrwalona) w dniu 70. po urodzeniu	10/płeć (1/miot)
neuropatologia (zanurzenie lub utrwalenie perfuzyjne) między dniem 11. a 22. po urodzeniu	10/płeć (1/miot)
neuropatologia (utrwalenie perfuzyjne) w dniu 70. po urodzeniu	10/płeć (1/miot)
dojrzałość płciowa	20/płeć (1/płeć/miot)
inne charakterystyczne punkty rozwojowe (opcjonalne)	wszystkie zwierzęta
rozwój zachowań	20/płeć (1/płeć/miot)
aktywność ruchowa	20/płeć (1/płeć/miot)
funkcje motoryczno-sensoryczne	20/płeć (1/płeć/miot)
uczenie się i pamięć	10/płeć ([a]) (1/miot)

([a]) W zależności od czułości badań funkcji poznawczych należy rozważyć przeprowadzenie badania na dużo większej liczbie zwierząt, np. do 1 samca i 1 samicy na miot (w odniesieniu do przydzielania zwierząt zob. dodatek 1) (dalsze wytyczne dotyczące liczebności próby objęto dokumentem zawierającym wytyczne OECD nr 43 (8)).

▼M5

Dawkowanie

16. Należy zastosować co najmniej trzy poziomy dawek i wprowadzić równoczesną grupę kontrolną. Dawki powinny być zróżnicowane w celu osiągnięcia stopniowania efektów toksycznych. Jeżeli charakter fizykochemiczny lub właściwości biologiczne substancji chemicznej nie powodują ograniczenia dawki, najwyższą dawkę należy dobrać w taki sposób, aby wywołać pewną toksyczność matczyną (np. objawy kliniczne, obniżony przyrost masy ciała (nie więcej niż 10 %) lub oznaki toksyczności ograniczającej wielkość dawki w organie docelowym). Z pewnymi wyjątkami dużą dawkę można ograniczyć do 1 000 mg/kg masy ciała/dzień. Na przykład przewidywane narażenie ludzi może wskazać na potrzebę zastosowania większej dawki. Ewentualnie należy przeprowadzić badania pilotażowe lub badania wstępne mające na celu ustalenie zakresu, aby określić największe dawkowanie, które można zastosować, a które wywoła minimalny stopień toksyczności matczynej. Jeżeli badana substancja chemiczna wykazała toksyczność rozwojową w standardowym badaniu toksyczności rozwojowej lub w badaniu pilotażowym, największa dawka powinna stanowić maksymalną dawkę niewywołującą nadmiernej toksyczności u potomstwa ani zgonu *in utero* lub neonatalnego lub wad rozwojowych, co wystarcza, aby uniemożliwić znaczącą ocenę neurotoksyczności. Najmniejsza dawka nie powinna wywoływać żadnych oznak toksyczności matczynej ani rozwojowej, w tym neurotoksyczności. Należy dobrać malejącą sekwencję dawek w celu wykazania wszystkich zależności dawka-odpowiedź i poziomów dawkowania, przy których nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL), lub dawki bliskie granicy wykrywalności, które pozwolą określić dawkę wyznaczającą. W odniesieniu do ustalenia malejących dawek często jest optymalne wprowadzenie podwójnych do poczwórnych odstępów, a dodanie czwartej grupy dawkowania jest na ogół lepsze niż stosowanie bardzo dużych odstępów (np. współczynnik większy od 10) między dawkowaniami.

17. Dawki należy dobierać, uwzględniając wszystkie istniejące dane dotyczące toksyczności oraz dodatkowe informacje na temat metabolizmu i toksykokinetyki badanej substancji chemicznej lub powiązanych materiałów. Informacje te mogą również pomóc w wykazaniu stosowności schematu dawkowania. Należy rozważyć bezpośrednie podawanie dawki młodym na podstawie informacji dotyczących narażenia i farmakokinetyki (28)(29). Przed przeprowadzeniem badań polegających na bezpośrednim dawkowaniu należy uważnie rozważyć ich zalety i ich wady (30).

18. Równoległa grupa kontrolna powinna stanowić grupę kontrolną poddaną terapii pozorowanej lubgrupę kontrolną nośnika, jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej stosowany jest nośnik. Wszystkim zwierzętom należy zwykle podawać taką samą ilość badanej substancji chemicznej lub nośnika obliczaną na podstawie masy ciała. Jeżeli w celu ułatwienia dawkowania używa się nośnika lub innego dodatku, należy uwzględnić następujące cechy charakterystyczne: wpływ na wchłanianie, dystrybucję, metabolizm lub zatrzymywanie badanej substancji chemicznej; wpływ na właściwości chemiczne badanej substancji chemicznej, które mogą zmienić jej charakterystykę toksyczną; oraz wpływ na przyjmowanie pokarmu lub wody, lub stan odżywienia zwierząt. Nośnik nie powinien wywoływać skutków, które mogłyby przeszkodzić w interpretacji wyników badania, ani nie powinien być toksyczny neurobehawioralnie, ani wpływać na reprodukcję lub rozwój. W przypadku nowatorskich nośników oprócz grupy kontrolnej nośnika należy włączyć grupę kontrolną poddaną terapii pozorowanej. Zwierzęta w grupie kontrolnej (grupach kontrolnych) powinny być traktowane w dokładnie taki sam sposób jak zwierzęta w grupach badanych.

▼M5

Podawanie dawek

19. Badaną substancję chemiczną lub nośnik należy podawać najbardziej odpowiednią drogą w odniesieniu do potencjalnego narażenia u człowieka i na podstawie dostępnych informacji dotyczących metabolizmu i dystrybucji u badanych zwierząt. Drogą podawania będzie z reguły droga pokarmowa (np. przez sondę, z paszą, z wodą pitną), ale można wykorzystać inne drogi (np. naskórną lub wziewną) w zależności od cech charakterystycznych i przewidywanych lub znanych dróg narażenia u człowieka (dalsze wytyczne można znaleźć w dokumencie zawierającym wytyczne OECD nr 43 (8)). Należy uzasadnić wybór drogi podawania. Badaną substancję chemiczną należy podawać każdego dnia mniej więcej o tej samej porze.

20. Dawka podawana każdemu zwierzęciu powinna zwykle zależeć od bieżącej masy ciała danego osobnika. Należy jednak zachować ostrożność przy dostosowywaniu dawek w ostatnim trymestrze ciąży. Jeżeli odnotuje się nadmierną toksyczność u matek objętych podawaniem, należy uśmiercić je w sposób humanitarny.

21. Badaną substancję chemiczną lub nośnik należy podawać pokrytym samicom co najmniej raz dziennie od momentu zagnieżdżenia (6. dzień ciąży) przez cały okres laktacji (dzień 21. po urodzeniu), w związku z czym młode są poddawane narażeniu na badaną substancję chemiczną w okresie neurologicznego rozwoju przedurodzeniowego i pourodzeniowego. Wiek, w którym rozpoczyna się dawkowanie, oraz okres trwania i częstotliwość dawkowania można skorygować, jeżeli istnieją dowody na to, że taki schemat doświadczalny jest bardziej odpowiedni w odniesieniu do narażenia u ludzi. Należy skorygować okresy trwania dawkowania w odniesieniu do innych gatunków, aby zapewnić narażenie w czasie wszystkich wczesnych okresów rozwoju mózgu (tj. równoważnych rozwojowi mózgu człowieka w okresie przed urodzeniem i wczesnym okresie po urodzeniu). Dawkowanie można rozpocząć na początku ciąży (0. dzień ciąży), ale należy uwzględnić możliwość, że badana substancja chemiczna spowoduje utratę zarodka przed zagnieżdżeniem. Rozpoczęcie podawania w 6. dniu ciąży wyeliminowałoby to ryzyko, ale nie pozwoliłoby to zbadać stadiów rozwojowych między 0. a 6. dniem ciąży. W przypadku gdy laboratorium nabywa zwierzęta kryte w znanym czasie, rozpoczęcie dawkowania w 0. dniu ciąży jest niepraktyczne, zatem 6. dzień ciąży byłby dobrym punktem wyjściowym. Laboratorium badawcze powinno określić schemat dawkowania zgodnie z odpowiednimi informacjami dotyczącymi skutków badanej substancji chemicznej, wcześniejszymi doświadczeniami i kwestiami logistycznymi; może on obejmować przedłużenie dawkowania w okresie po odsadzeniu. Dawkowanie nie powinno mieć miejsca w dniu porodu w przypadku tych zwierząt, u których poród był niekompletny. Ogólnie rzecz biorąc, zakłada się, że młode zostaną poddane narażeniu przez mleko matki, należy jednak rozważyć bezpośrednie podawanie dawki młodym w tych przypadkach, w których nie ma dowodów stałego narażenia potomstwa. Dowody stałego narażenia można uzyskać np. z informacji farmakokinetycznych, toksyczności dla potomstwa lub zmian w biomarkerach (28).

OBSERWACJE

Obserwacje matek

22. Co najmniej raz dziennie należy przeprowadzić skrupulatną obserwację wszystkich matek pod kątem warunków dotyczących ich zdrowia, w tym zachorowalności i śmiertelności.

23. W czasie doświadczenia i obserwacji należy okresowo prowadzić bardziej szczegółowe obserwacje kliniczne (przynajmniej dwa razy w okresie dawkowania w czasie ciąży i dwa razy w okresie dawkowania w czasie laktacji), wykorzystując co najmniej dziesięć matek na każdą dawkę. Obserwacje zwierząt na zewnątrz klatki macierzystej powinni przeprowadzić wyszkoleni technicy, którzy nie wiedzą o podawaniu zwierzętom substancji chemicznych, stosując standardowe procedury w celu ograniczenia do minimum stresu u zwierząt i stronniczości obserwatora oraz uzyskania maksymalnej wiarygodności kilku obserwatorów. Zaleca się, aby obserwacje w danym badaniu przeprowadzał ten sam technik, jeżeli istnieje taka możliwość.

▼M5

24. Należy odnotować występowanie obserwowanych objawów. W przypadkach, w których jest to możliwe, należy również odnotować skalę obserwowanych objawów. Obserwacje kliniczne powinny obejmować między innymi zmiany w skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego(np. łzawienie, piloreksja, rozmiar źrenicy, zmieniony rytm oddychania lub oddychanie przez jamę ustną i wszelkie nietypowe objawy związane z oddawaniem moczu lub wypróżnianiem).

25. Należy również odnotowywać wszelkie nietypowe reakcje dotyczące pozycji ciała, poziomu aktywności (np. obniżenie lub podwyższenie poziomu eksploracji standardowej powierzchni) i koordynacji ruchowej. Należy także odnotować zmiany w sposobie chodzenia (np. chód kaczkowaty, ataksja), postawie (np. przygarbiony grzbiet) i reaktywności na kontakt, przenoszenie i inne bodźce ze środowiska, jak również obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, konwulsji, drżenia, stereotypii (np. nadmiernego czyszczenia się, nietypowych ruchów głową, powtarzanego kręcenia się), lub dziwnych zachowań (np. gryzienia lub nadmiernego wylizywania, samookaleczania, chodzenia do tyłu, wydawania dźwięków) lub agresji.

26. Należy odnotować wszystkie oznaki toksyczności, w tym dzień ich wystąpienia, porę dnia, stopień i okres trwania.

27. W okresie dawkowania należy ważyć zwierzęta przynajmniej raz na tydzień przez cały okres trwania badania, w dniu porodu lub tuż przed lub po nim i w dniu 21. po urodzeniu (odsadzenie). W przypadku badań z wykorzystaniem sondy należy ważyć matki przynajmniej dwa razy w tygodniu. Dawki powinny być korygowane w momencie określania masy ciała każdego osobnika, stosownie do przypadku. Należy co tydzień mierzyć ilość przyjmowanego pokarmu, co najmniej w okresach ciąży i laktacji. Ilość wypitej wody powinna być mierzona co najmniej raz w tygodniu, jeżeli zwierzę jest poddane narażeniu za pośrednictwem wody pitnej.

Obserwacje potomstwa

28. Co najmniej raz dziennie należy przeprowadzić skrupulatną obserwację całego potomstwa pod kątem oznak toksyczności i zachorowalności oraz śmiertelności.

29. W okresach podawania substancji i obserwacji należy prowadzić bardziej szczegółowe obserwacje kliniczne potomstwa. Obserwacje potomstwa (przynajmniej jednego młodego/płeć/miot) powinni prowadzić wyszkoleni technicy, którzy nie wiedzą o podawaniu zwierzętom substancji, stosując standardowe procedury w celu ograniczenia do minimum stronniczości oraz uzyskania maksymalnej wiarygodności kilku obserwatorów. Zaleca się, aby obserwacje przeprowadzał ten sam technik, jeżeli istnieje taka możliwość. Należy monitorować co najmniej punkty końcowe opisane w pkt 24 i 25 stosownie do obserwowanego stadium rozwojowego.

30. Należy odnotować wszystkie oznaki toksyczności u potomstwa, w tym dzień ich pojawienia się, porę dnia, stopień i okres trwania.

Fizyczne i rozwojowe punkty charakterystyczne

31. Zmiany w charakterystycznych punktach rozwojowych w okresie przed odsadzeniem (np. rozwijanie się małżowiny ucha, otwieranie oczu, wyrzynanie się siekaczy) są ściśle związane z masą ciała (30)(31). Masa ciała może być najlepszym wskaźnikiem rozwoju fizycznego. W związku z tym zaleca się dokonywanie pomiarów charakterystycznych punktów rozwojowych jedynie wówczas, gdy wcześniej pojawiły się oznaki wskazujące, że te punkty końcowe będą stanowić źródło dodatkowych informacji. Częstotliwość przeprowadzania oceny tych parametrów przedstawiono w tabeli 1. W zależności od przewidywanych skutków i wyników pomiarów wstępnych może być zalecane wprowadzenie dodatkowych punktów czasowych lub wykonanie pomiarów na innych stadiach rozwojowych.

▼M5

32. Do oceny rozwoju fizycznego zaleca się wykorzystywanie zwierząt w okresie po kopulacji, a nie w okresie po urodzeniu (33). Jeżeli przeprowadza się badanie na młodych w dniu odsadzenia, zaleca się, aby badanie to zostało przeprowadzone przed faktycznym odsadzeniem w celu uniknięcia efektu dezorientacji zwierząt spowodowanego stresem towarzyszącym odsadzeniu. Ponadto wszelkie badania na młodych w okresie po odsadzeniu nie powinny być prowadzone przez pierwsze dwa dni po odsadzeniu.

Tabela 1

Częstotliwość przeprowadzania oceny charakterystycznych punktów fizycznych i rozwojowych oraz funkcjonalnych/behawioralnych punktów końcowych [a]

Okres rozwoju / Punkty końcowe	Przed odsadzeniem [b]	Dojrzewanie [b]	Wczesna dorosłość [b]
Charakterystyczne punkty fizyczne i rozwojowe			
Masa ciała i obserwacje kliniczne	co tydzień [c]	co najmniej raz na dwa tygodnie	co najmniej raz na dwa tygodnie
Masa mózgu	dzień 22. po urodzeniu [d]		na koniec badania
Neuropatologia	dzień 22. po urodzeniu [d]		na koniec badania
Dojrzewanie płciowe	—	w stosownych przypadkach	—
Inne charakterystyczne punkty rozwojowe [e]	w stosownych przypadkach	—	—
Funkcjonalne/behawioralne punkty końcowe			
Rozwój zachowań	co najmniej dwa pomiary		
Aktywność ruchowa (w tym habituacja)	1–3 razy [f]	—	raz
Funkcje motoryczno-sensoryczne	—	raz	raz
Uczenie się i pamięć	—	raz	raz

[a] W powyższej tabeli przedstawiono minimalną liczbę wykonywania pomiarów. W zależności od przewidywanych skutków i wyników pomiarów wstępnych może być zalecane wprowadzenie dodatkowych punktów czasowych (np. stare zwierzęta) lub wykonanie pomiarów na innych stadiach rozwojowych.

[b] Zaleca się, aby młode nie były poddawane badaniom przez pierwsze dwa dni po odsadzeniu (zob. pkt 32). Zalecanym wiekiem do przeprowadzania badań na zwierzętach w okresie dojrzewania jest: w odniesieniu do uczenia się i pamięci = dzień 25. ± 2 po urodzeniu; w odniesieniu do funkcji motoryczno-sensorycznych = dzień 25. ± 2 po urodzeniu. Zalecanym wiekiem do przeprowadzania badań na młodych dorosłych jest dzień 60–70. po urodzeniu.

[c] W przypadku młodych objętych bezpośrednim dawkowaniem należy co najmniej dwa razy w tygodniu dokonywać pomiarów mas ciała w celu korygowania dawek w czasie gwałtownego przyrostu masy ciała.

[d] W stosownych przypadkach masy mózgu i neuropatologię można ocenić trochę wcześniej (np. w dniu 11 po urodzeniu) (zob. pkt 39).

[e] Oprócz masy ciała należy zarejestrować, w stosownych przypadkach, inne charakterystyczne punkty rozwojowe (np. otwieranie oczu) (zob. pkt 31).

[f] Zob. pkt 35.

33. Należy policzyć żywe młode i określić ich płeć, np. dokonując kontroli wizualnej lub pomiaru odległości anogenitalnej (34)(35), a każde młode z miotu powinno być indywidualnie ważone przy porodzie lub wkrótce po nim, co najmniej raz w tygodniu w okresie laktacji i co najmniej raz na dwa tygodnie po nim. Podczas dokonywania oceny dojrzałości płciowej należy określić wiek i masę ciała zwierzęcia w momencie otwarcia pochwy (36) lub oddzielenia napletka (37) co najmniej w odniesieniu do jednego samca i jednej samicy na miot.

▼M5

Rozwój zachowań

34. Należy dokonywać pomiarów rozwoju wybranych zachowań u co najmniej jednego młodego/płeć/miot w odpowiednim okresie wiekowym, przy czym to samo młode jest wykorzystywane przez wszystkie dni badania do oceny wszystkich zachowań. Należy zachować jednakowy odstęp dni pomiarów w tym okresie, aby określić normalne lub związane z doświadczeniem zmiany w rozwoju danego zachowania (38). Niektóre przykłady zachowań, w odniesieniu do których można ocenić ich rozwój, są następujące: odruch przyjmowania wyprostowanej postawy, ujemna geotaksja i aktywność ruchowa (38)(39)(40).

Aktywność ruchowa

35. Należy monitorować aktywność ruchową (41)(42)(43)(44)(45) w okresie przed odsadzeniem i w wieku dorosłym. W odniesieniu do badań w czasie odsadzania zob. pkt 32. Sesja badawcza powinna być na tyle długa, aby wykazać w jej trakcie habituację grup kontrolnych nieobjętych narażeniem. Wyraźnie zaleca się wykorzystanie aktywności ruchowej do oceny rozwoju zachowań. Jeżeli wykorzystuje się ją do badania rozwoju zachowań, we wszystkich sesjach badawczych prowadzonych przed odsadzeniem powinno się poddawać ocenie te same zwierzęta. Badanie powinno odbywać się wystarczająco często, aby ocenić rozwój habituacji w trakcie danej sesji (44). W tym celu mogą być wymagane trzy lub więcej okresów czasu, obejmujące okres przed odsadzeniem i dzień odsadzenia (np. dni 13., 17., 21. po urodzeniu). Badanie tych samych zwierząt lub zwierząt z jednego miotu powinno także mieć miejsce w odniesieniu do zwierząt dorosłych tuż przed zakończeniem badania (np. dzień 60–70. po urodzeniu). W razie potrzeby można przeznaczyć dodatkowe dni na badanie. Należy monitorować aktywność ruchową za pomocą zautomatyzowanego sprzętu do rejestrowania aktywności, który powinien być w stanie wykryć zarówno wzrost, jak i obniżenie aktywności (tj. podstawowy poziom aktywności mierzony przez urządzenie nie powinien być tak niski, aby uniemożliwić wykrycie obniżenia aktywności, ani tak wysoki, aby uniemożliwić wykrycie jej wzrostu). Każde urządzenie powinno zostać przetestowane w ramach standardowych procedur, aby zapewnić na ile to tylko możliwe niezawodność działania poszczególnych urządzeń w poszczególnych dniach. Na ile to możliwe eksperymentalne grupy powinny zostać przydzielone równomiernie do poszczególnych urządzeń. Każde zwierzę należy badać indywidualnie. Należy równomiernie dostosować grupy eksperymentalne do pór dnia badania, aby uniknąć zakłócenia wywołanego dobowym rytmem aktywności biologicznej. Należy dołożyć starań, aby rozbieżności w warunkach badania były minimalne i niepowiązane systematycznie z podawaniem. Do zmiennych, które mogą wpłynąć na wiele składowych pomiaru zachowania, w tym aktywność ruchową, należą poziom dźwięku, rozmiar i kształt klatki do badań, temperatura, wilgotność względna, warunki świetlne, zapachy, stosowanie klatki macierzystej lub nowatorskiej klatki do badań i zakłócenia środowiskowe.

Funkcje motoryczno-sensoryczne

36. Należy szczegółowo zbadać funkcje motoryczno-sensoryczne co najmniej raz w okresie dojrzewania i raz na wczesnym etapie dorosłości (np. dzień 60–70. po urodzeniu). W odniesieniu do badań w czasie odsadzania zob. pkt 32. Należy przeprowadzić ilość testów wystarczającą do zapewnienia odpowiedniego ilościowego próbkowania modalności sensorycznych (np. somatosensorycznych, równowagi) i funkcji motorycznych (np. siła, koordynacja). Niektóre przykłady badań dotyczących funkcji motoryczno-sensorycznych obejmują odruch prostowania się (46), odruch przyjmowania prawidłowej pozycji (47)(48), habituację do nagłych dźwięków (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) oraz potencjały wywołane (55).

▼M5

Badania dotyczące uczenia się i pamięci

37. Po odsadzeniu (np. w dniu 25. ± 2 po urodzeniu) i w odniesieniu do młodych dorosłych (dzień 60. po urodzeniu i starsze) należy przeprowadzić badanie asocjacyjnego uczenia się i pamięci. W odniesieniu do badań w czasie odsadzania zob. pkt 32. Na tych dwóch etapach rozwojowych można zastosować to samo badanie lub różne badania. Dopuszcza się pewną elastyczność w wyborze badania (badań) w odniesieniu do uczenia się i pamięci u szczurów odsadzanych i dorosłych. Badania muszą być jednak skonstruowane w taki sposób, aby spełniały dwa kryteria. Po pierwsze, należy oceniać uczenie się jako zmianę w szeregu powtarzanych prób lub sesji uczenia się lub, w badaniach składających się z pojedynczej próby, w odniesieniu do warunku kontrolującego nieasocjacyjne skutki przyzwyczajenia. Po drugie, oprócz podstawowego uczenia się (przyswajania) badania powinny obejmować niektóre pomiary pamięci (krótkotrwałej lub długotrwałej), ale nie można odnotować tego pomiaru pamięci, jeżeli brak jest pomiaru przyswajania uzyskanego w tym samym badaniu. Jeżeli badania uczenia się i pamięci wykażą wpływ badanej substancji chemicznej, można rozważyć przeprowadzenie dodatkowych badań w celu wykluczenia alternatywnych interpretacji na podstawie zmian w zdolnościach sensorycznych, motywacyjnych lub motorycznych. Poza powyższymi dwoma kryteriami zaleca się, aby wybór badania dotyczącego uczenia się i pamięci był oparty na wykazanej w badaniu czułości na klasę badanej substancji chemicznej, jeżeli informację dotyczącą tej wrażliwości można znaleźć w literaturze. W przypadku braku takiej informacji przykłady badań, które mogłyby zostać przeprowadzone, aby spełnić powyższe kryteria, obejmują: unikanie bierne (43)(56)(57), opóźnienie w orientacji przestrzennej w przypadku dorosłych szczurów (58) i szczurów tuż po urodzeniu (59), warunkowanie węchowe (43)(60), labirynt wodny Morrisa (61)(62)(63), labirynt Biela lub labirynt typu Cincinnati (64)(65), koncentrycznie ramienny labirynt (66), labirynt typu T (43) oraz nabycie i utrzymanie zachowań kontrolowanych zgodnie z planem (26)(67)(68). Dodatkowe badania opisano w literaturze dotyczącej szczurów odsadzonych (26)(27) i dorosłych szczurów (19)(20).

Sekcja zwłok

38. Po odsadzeniu potomstwa matki można poddać eutanazji.

39. Ocena neuropatologiczna potomstwa zostanie przeprowadzona przy użyciu tkanek zwierząt uśmierconych w sposób humanitarny w dniu 22. po urodzeniu lub we wcześniejszym punkcie czasowym między dniem 11. a 22. po urodzeniu oraz na koniec badania. W przypadku potomstwa uśmierconego w dniu 22. po urodzeniu należy ocenić tkanki mózgu, a w przypadku zwierząt uśmierconych na koniec badania należy ocenić zarówno tkanki ośrodkowego układu nerwowego, jak i tkanki obwodowego układu nerwowego. Zwierzęta uśmiercone w dniu 22. po urodzeniu lub wcześniej mogą zostać utrwalone za pomocą zanurzenia lub perfuzji. Zwierzęta uśmiercone na koniec badania należy utrwalić za pomocą perfuzji. Na wszystkich etapach preparowania próbek tkanek, począwszy od procesu perfuzji zwierząt przez wycinanie próbek tkanki, przetwarzanie tkanki i barwienie preparatów, należy stosować zrównoważony schemat, tak aby każda seria zawierała reprezentatywne próbki z każdej grupy dawkowania. Dodatkowe wytyczne dotyczące neuropatologii można znaleźć w dokumencie zawierającym wytyczne OECD nr 20 (9), zob. również (103).

Przetwarzanie próbek tkanki

40. Θα πρέπει να σημειώνονται όλες οι μακροσκοπικές ανωμαλίες που είναι εμφανείς κατά τη νεκροψία. Τα λαμβανόμενα δείγματα ιστών θα πρέπει να αντιπροσωπεύουν όλες τις σημαντικές περιοχές του νευρικού συστήματος, να διατηρούνται σε κατάλληλο μέσο μονιμοποίησης και να υποβάλλονται σε επεξεργασία σύμφωνα με τυποποιημένα δημοσιευμένα ιστολογικά πρωτόκολλα (69)(70)(71) (103). Ο εγκλεισμός σε παραφίνη είναι αποδεκτός για τους ιστούς του ΚΝΣ και του ΠΝΣ, αλλά ενδέχεται να

▼M5

είναι σκόπιμη η χρήση οσμίου μετά τη μονιμοποίηση, σε συνδυασμό με εγκλεισμό σε εποξειδική ρητίνη, όταν απαιτείται υψηλότερος βαθμός ανάλυσης (π.χ. για περιφερειακά νεύρα, όταν υπάρχουν υπόνοιες περιφερειακής νευροπάθειας και/ή για τη μορφομετρική ανάλυση περιφερειακών νεύρων. Οι εγκεφαλικοί ιστοί που συλλέγονται για μορφομετρική ανάλυση θα πρέπει να εγκλείονται σε κατάλληλα μέσα σε όλα τα επίπεδα δόσης ταυτόχρονα, ώστε να αποφεύγονται τεχνικά σφάλματα λόγω συρρίκνωσης που μπορεί να συνδέονται με παρατεταμένη φύλαξη σε μέσο μονιμοποίησης (6).

Badanie neuropatologiczne

41. Cele obserwacji jakościowej są następujące:

(i) identyfikacja obszarów w układzie nerwowym wykazujących dowody zmian neuropatologicznych;

(ii) identyfikacja rodzajów zmian neuropatologicznych wynikających z narażenia na działanie badanej substancji chemicznej; oraz

(iii) określenie zakresu dotkliwości zmian neuropatologicznych.

Odpowiednio wyszkolony patolog powinien zbadać mikroskopowo reprezentatywne wycinki histologiczne próbek tkanek pod kątem wystąpienia zmian neuropatologicznych. Wszystkim zmianom neuropatologicznym należy przypisać subiektywny stopień wskazujący dotkliwość. Barwniki hemotaksylina i eozyna mogą być wystarczające do przeprowadzenia oceny wycinków mózgu zwierząt uśmierconych w sposób humanitarny w dniu 22. po urodzeniu lub wcześniej. W odniesieniu do wycinków tkanek ośrodkowego układu nerwowego i obwodowego układu nerwowego pochodzących od zwierząt uśmierconych na koniec badania zaleca się jednak barwnik mieliny (np. luxol fast blue/fiolet krezylowy) i barwnik srebrny (do barwienia metodą Bielschowsky'ego lub Bodiana (srebrzenie)). Z zastrzeżeniem profesjonalnego osądu patologa i rodzaju zaobserwowanych zmian można uznać adekwatność innych barwników do identyfikowania i scharakteryzowania szczególnych rodzajów zmian (np. kwaśne białko włókienkowe (GFAP) lub histochemia lektyn do oceny zmian komórek glejowych lub mikroglejowych (72), fluorochrom Fluor-Jade do wykrywania martwicy (73)(74), lub barwniki srebrne, w szczególności w odniesieniu do chorób neurodegeneracyjnych (75)).

42. Należy przeprowadzić ocenę morfometryczną (ilościową), ponieważ uzyskane z niej dane mogą pomóc w wykrywaniu skutków związanych z podawaniem i są cenne w interpretowaniu związanych z podawaniem różnic w masie mózgu lub morfologii (76)(77). Należy pobrać próbki tkanki nerwowej i spreparować je w celu umożliwienia przeprowadzenia oceny morfometrycznej. Ocena morfometryczna może obejmować np. pomiary liniowe lub powierzchniowe określonych obszarów mózgu (78). Pomiary liniowe lub powierzchniowe wymagają zastosowania homologicznych wycinków, które starannie wybrano na podstawie wiarygodnych, mikroskopowych punktów charakterystycznych (6). Można zastosować stereologię w celu zidentyfikowania związanego z podawaniem wpływu na parametry takie jak objętość lub liczba komórek w odniesieniu do określonych obszarów neuroanatomicznych (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Należy zbadać mózgi pod kątem wszelkich dowodów zmian neuropatologicznych związanych z podawaniem i pobrać odpowiednie próbki ze wszystkich głównych obszarów mózgu (np. opuszków węchowych, kory mózgu, hipokampu, jądra podstawnego, wzgórza, podwzgórza, śródmózgowia (pokrywy śródmózgowia, nakrywki śródmózgowia i konarów mózgu), mostu, rdzenia przedłużonego, móżdżka), aby zapewnić dokładność badania. Ważne jest, aby wycinki od wszystkich zwierząt zostały pobrane w tej samej płaszczyźnie. W odniesieniu do zwierząt dorosłych uśmierconych w sposób humanitarny na koniec badania należy pobrać próbki reprezentatywnych wycinków rdzenia kręgowego i obwodowego układu nerwowego. Obszary badane powinny obejmować oko z nerwem wzrokowym i siatkówką, rdzeń kręgowy na poziomie opuchniętych kręgów szyjnych i lędźwiowych, włókno korzeni grzbietowych i brzusznych, proksymalny odcinek nerwu kulszowego, proksymalny odcinek nerwu piszczelowego (przy kolanie) i gałęzie mięśniowe nerwu piszczelowego. Skrawki rdzenia kręgowego i nerwów obwodowych powinny obejmować przekroje poprzeczne i podłużne.

▼M5

44. Oprócz zmian komórkowych (np. wakuolizacji neuronów, degeneracji, martwicy) i zmian tkanek (np. glejozy, nacieku leukocytów, torbieli) ocena neuropatologiczna powinna obejmować badanie pod kątem wskaźników zaburzeń rozwojowych w układzie nerwowym (6)(85)(86)(87)(88)(89). W tym względzie ważne jest odróżnienie skutków związanych z podawaniem od zwykłych zjawisk związanych z rozwojem, o których wiadomo, że wystąpią w stadium rozwojowym odpowiadającym czasowi uśmiercenia (90). Przykłady znacznych zmian, które wskazują na nieprawidłowy rozwój, obejmują między innymi:

— zmiany wielkości lub kształtu opuszek węchowych, mózgu lub móżdżka,

— zmiany względnej wielkości różnych obszarów mózgu, w tym zmniejszenia lub powiększenia wielkości obszarów wynikające ze straty lub utrzymywania się zwykle przejściowych populacji komórek bądź rzutów neuronów (np. zewnętrzne listki zarodkowe móżdżka, ciało modzelowate),

— zmiany w proliferacji, migracji i różnicowaniu, na które wskazują obszary nadmiernej apoptozy lub martwicy, skupiska lub rozproszone populacje ektopowych, zdezorientowanych lub zdeformowanych neuronów lub zmian we względnej wielkości różnych warstw struktur korowych,

— zmiany w strukturach mielinacji, w tym ogólna redukcja wielkości lub zmienione barwienie struktur mielinowych,

— oznaki wodogłowia, w szczególności powiększenie komór, zwężenie wodociągu mózgu i coraz cieńsze półkule mózgu.

Analiza zależności dawka-odpowiedź w zmianach neuropatologicznych

45. Do celów przeprowadzenia neuropatologicznej analizy jakościowej i ilościowej zaleca się stosowanie następujących procedur sekwencyjnych. Po pierwsze, wycinki z grupy otrzymującej wysoką dawkę porównuje się z wycinkami pozyskanymi z grupy kontrolnej. Jeżeli u zwierzęcia z grupy otrzymującej wysoką dawkę nie wykryto żadnych zmian neuropatologicznych, dalsze analizy nie są wymagane. Jeżeli w grupie otrzymującej wysoką dawkę występują zmiany neuropatologiczne, poddaje się badaniom zwierzęta z grupy otrzymującej średnią dawkę i z grupy otrzymującej niską dawkę. W przypadku gdy grupa otrzymująca wysoką dawkę zostaje wyeliminowana ze względu na śmierć lub inną zakłócającą toksyczność, należy zbadać grupy otrzymujące średnią i niską dawkę pod kątem zmian neuropatologicznych. W przypadku wystąpienia jakiejkolwiek oznaki neurotoksyczności w grupach otrzymujących niższe dawki należy przeprowadzić w tych grupach badanie neuropatologiczne. Jeżeli podczas badania jakościowego lub ilościowego wykryto jakiekolwiek zmiany neuropatologiczne związane z podawaniem, należy określić zależność tej zmiany od dawki oraz częstotliwość i stopień dotkliwości zmian patologicznych lub zmian morfometrycznych na podstawie oceny wszystkich zwierząt ze wszystkich grup dawkowania. Należy objąć tą oceną wszystkie obszary mózgu, w których występują jakiekolwiek oznaki zmian neuropatologicznych. W odniesieniu do każdego rodzaju zmiany patologicznej należy opisać cechy charakterystyczne stosowane przy określaniu każdego stopnia dotkliwości, wskazując na te cechy, które różnicują poszczególne stopnie. Należy odnotować częstotliwość występowania każdego rodzaju zmiany i stopień jej dotkliwości oraz przeprowadzić analizę statystyczną w celu dokonania oceny charakteru zależności dawka-odpowiedź. Zaleca się stosowanie zakodowanych szkiełek laboratoryjnych (91).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

46. Dane należy odnotowywać oddzielnie w formie zestawień tabelarycznych przedstawiających w odniesieniu do każdej grupy badanej rodzaj zmiany i liczbę matek, liczbę potomstwa w podziale na płeć i liczbę miotów, u których wystąpił każdy rodzaj zmiany. Jeżeli przeprowadzono bezpośrednie narażenie potomstwa po urodzeniu, należy odnotować drogę, czas trwania i okres narażenia.

▼M5

Ocena i interpretacja wyników

47. Badanie neurotoksyczności rozwojowej dostarczy informacji na temat wpływu powtarzanego narażenia na substancję chemiczną podczas rozwoju *in utero* i wczesnego rozwoju po urodzeniu. Ponieważ szczególną uwagę przywiązuje się do punktów końcowych toksyczności ogólnej i neurotoksyczności rozwojowej, wyniki badania pozwolą na odróżnienie skutków neurorozwojowych występujących przy braku ogólnej toksyczności matczynej od występujących jedynie na poziomach, które są toksyczne również dla matki. Ze względu na złożone wzajemne powiązania między projektem badania, analizą statystyczną i biologicznym znaczeniem danych odpowiednia interpretacja danych dotyczących neurotoksyczności rozwojowej będzie wymagała profesjonalnego osądu (107)(109). Przy interpretowaniu wyników badania należy stosować podejście wagi dowodów (20)(92)(93)(94). Należy omówić wzory wyników badań behawioralnych lub morfologicznych, jeżeli występują, oraz dowody zależności dawka-odpowiedź. W tej charakterystyce należy zawrzeć dane pochodzące ze wszystkich badań powiązanych z oceną neurotoksyczności rozwojowej, w tym badań epidemiologicznych lub studiów przypadków u ludzi, i badań na zwierzętach doświadczalnych (np. dane toksykokinetyczne, informacje dotyczące związku między strukturą a działaniem, dane z innych badań toksyczności). Obejmują one związek między dawkami badanej substancji chemicznej a obecnością lub brakiem, częstotliwością występowania i zakresem każdego skutku neurotoksycznego w odniesieniu do każdej płci (20)(95).

48. Ocena danych powinna obejmować omówienie istotności biologicznej i statystycznej. Należy postrzegać analizę statystyczną raczej jako narzędzie, które nie determinuje interpretacji danych, a tylko wskazuje sposób. Brak istotności statystycznej nie powinien stanowić jedynego uzasadnienia dla stwierdzenia braku skutków związanych z podaniem, tak jak istotność statystyczna nie powinna stanowić jedynego uzasadnienia dla stwierdzenia skutków związanych z podaniem. Aby chronić przed ewentualnie fałszywie ujemnymi wynikami i trudnościami wiążącymi się nieodłącznie z „przeprowadzaniem dowodu negatywnego", należy omówić dostępne dane dotyczące dodatniej i historycznej kontroli, zwłaszcza jeżeli nie występują skutki związane z podaniem (102)(106). Należy omówić prawdopodobieństwo fałszywie dodatnich wyników w kontekście całkowitej oceny statystycznej danych (96). Ocena powinna obejmować związek, jeżeli taki występuje, między obserwowanymi zmianami neuropatologicznymi i behawioralnymi.

49. Należy przeanalizować wszystkie wyniki, stosując modele statystyczne odpowiednie do schematu doświadczalnego (108). Należy uzasadnić wybór analizy parametrycznej lub nieparametrycznej, uwzględniając czynniki takie jak charakter danych (przetworzone lub nieprzetworzone) i ich rozkład oraz względną odporność wybranej analizy statystycznej. Wybór analizy statystycznej powinien być podyktowany celem i projektem badania, aby ograniczyć do minimum błędy typu I (fałszywie dodatnie) i typu II (fałszywie ujemne) (96)(97)(104)(105). W badaniach rozwojowych, w których wykorzystuje się gatunki wielorodne i w których badaniom poddana jest większa liczba młodych z danego miotu, należy uwzględnić miot w modelu statystycznym, aby uniknąć zbyt wielu błędów typu I (98)(99)(100)(101). Statystyczną jednostką miary powinien być miot, a nie młode. Doświadczenia powinny być zaprojektowane w taki sposób, aby zwierzęta z jednego miotu nie były traktowane jak oddzielne obiekty obserwacji. Należy kilkakrotnie przeprowadzić analizę każdego punktu końcowego mierzonego w tym samym podmiocie, stosując modele statystyczne, które wyjaśniają zależność tych pomiarów.

Sprawozdanie z badania

50. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— charakter fizyczny i, w stosownych przypadkach, właściwości fizykochemiczne,

— dane identyfikacyjne, w tym źródło,

▼M5

— czystość preparatu i znane lub przewidywane zanieczyszczenia.

Nośnik (w stosownych przypadkach):

— uzasadnienie wyboru nośnika, jeżeli jest inny niż woda lub roztwór soli fizjologicznej.

Badane zwierzęta:

— wykorzystany gatunek i szczep oraz uzasadnienie, jeżeli wykorzystano inne zwierzęta niż szczury,

— dostawca badanych zwierząt,

— liczba zwierząt, ich wiek na początku badań i ich płeć,

— źródło pochodzenia, warunki trzymania, pasza, woda itp.,

— masa ciała każdego zwierzęcia na początku badania.

Warunki badania:

— uzasadnienie w odniesieniu do wyboru poziomu dawki,

— uzasadnienie w odniesieniu do drogi dawkowania i okresu dawkowania,

— specyfikacje w zakresie podawanych dawek, w tym szczegóły dotyczące nośnika, objętości i formy fizycznej podawanego materiału,

— szczegóły dotyczące przygotowania formy użytkowej badanej substancji chemicznej/przygotowania paszy, uzyskanego stężenia, trwałości i jednorodności preparatu,

— metoda stosowana do niepowtarzalnej identyfikacji matek i potomstwa,

— szczegółowy opis procedur(-y) randomizacji stosowanych(-ej) do przydzielania matek do grup badanych, doboru młodych do eliminacji i przydzielania młodych do grup eksperymentalnych,

— szczegóły dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,

— w stosownych przypadkach przeliczenie stężeń (ppm) badanej substancji chemicznej w paszy/wodzie pitnej lub roztworze do inhalacji na dawkę faktyczną (mg/kg masy ciała/dzień),

— warunki środowiskowe,

— szczegóły dotyczące jakości pokarmu i wody (np. kranowa, destylowana),

— daty rozpoczęcia i zakończenia badania.

Obserwacje i procedury badawcze:

— szczegółowy opis procedur stosowanych do standaryzacji obserwacji i procedur oraz definicji operacyjnych do celów punktowego oceniania obserwacji,

— wykaz wszystkich procedur badawczych i uzasadnienie ich zastosowania,

— szczegóły dotyczące zastosowanych procedur badań behawioralnych/funkcjonalnych, patologicznych, neurochemicznych lub elektrofizjologicznych, w tym informacje i szczegóły dotyczące urządzeń automatycznych,

— procedury kalibracji i zapewniania równoważności urządzeń oraz bilansowanie grup eksperymentalnych w procedurach badawczych,

— krótkie uzasadnienie wyjaśniające wszelkie decyzje wiążące się z profesjonalnym osądem.

▼M5

Wyniki (indywidualne i zbiorcze, w tym średnia i wariancja w stosownych przypadkach):

— liczba zwierząt na początku badania i liczba zwierząt na końcu badania,

— liczba zwierząt i miotów wykorzystanych do każdej metody badawczej,

— numer identyfikacyjny każdego zwierzęcia i miot, z którego pochodzi,

— liczebność miotu i jego średnia ważona przy urodzeniu w podziale na płeć,

— masa ciała i dane dotyczące zmiany masy ciała, w tym masa ciała matek i potomstwa na koniec badań,

— dane dotyczące spożycia pokarmu oraz, w razie potrzeby, wypitej wody (np. jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana z wodą),

— dane dotyczące reakcji toksycznej według płci i dawki, w tym objawy toksyczności lub śmiertelność, w stosownych przypadkach z podaniem czasu i przyczyny śmierci,

— charakter szczegółowych obserwacji klinicznych, ich dotkliwość, czas trwania, dzień rozpoczęcia, pora dnia i ich późniejszy przebieg,

— wynik punktowy w odniesieniu do każdego charakterystycznego punktu rozwojowego (masy ciała, dojrzałości płciowej i rozwoju zachowań) z każdego okresu obserwacji,

— szczegółowy opis wszystkich wyników badań behawioralnych, funkcjonalnych, neuropatologicznych, neurochemicznych, elektrofizjologicznych według płci, w tym wzrosty i spadki w porównaniu do grupy kontrolnej,

— wyniki sekcji zwłok,

— masy mózgów,

— wszelkie diagnozy postawione na podstawie objawów neurologicznych i zmian patologicznych, w tym pojawiające się w sposób naturalny choroby lub warunki,

— obrazy przykładowych wyników badań,

— obrazy z urządzeń o małej mocy do oceny homologii wycinków zastosowanych do celów morfometrii,

— dane dotyczące wchłaniania i metabolizmu, w tym dane uzupełniające z odrębnych badań toksykokinetycznych, jeżeli są dostępne,

— statystyczne opracowanie wyników, w tym modele statystyczne zastosowane w celu analizy danych, i wyniki, niezależnie od tego, czy były istotne,

— wykaz personelu badawczego, w tym odbyte szkolenia zawodowe.

Omówienie wyników:

— informacje dotyczące zależności dawka-odpowiedź według płci i grupy,

— związek wszelkich innych skutków toksycznych z wnioskiem dotyczącym neurotoksycznego potencjału badanej substancji chemicznej według płci i grupy,

— wpływ wszelkich informacji toksykokinetycznych na wnioski,

— podobieństwa skutków do jakichkolwiek znanych środków neurotoksycznych,

▼M5

— dane potwierdzające wiarygodność i czułość metody badawczej (np. dodatnie i historyczne dane kontrolne),

— związki, jeżeli występują, między skutkami neuropatologicznymi a czynnościowymi,

— NOAEL lub dawka wyznaczająca w odniesieniu do matek i potomstwa według płci i grupy.

Wnioski:

— omówienie ogólnej interpretacji danych na podstawie wyników, w tym wniosek dotyczący tego, czy badana substancja chemiczna spowodowała neurotoksyczność rozwojową, i NOAEL.

LITERATURA

(1) OECD (1995), Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity, Kopenhaga, Dania, 13–14 czerwca 1995 r.

(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, Dostępne na stronie: [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. Dostępne na stronie: [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, s. 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, s. 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, s. 93–100.

(7) OECD (2003), Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing, Waszyngton D.C., US, 23–25 października 2000 r.

(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, Paryż, lipiec 2008 r. Dostępne na stronie: [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, Paryż, wrzesień 2003 r. Dostępne na stronie: [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, s. 173–292.

(11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000), *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, Nowy Jork.

▼**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, s. 188–197.

(13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998), *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, Nowy Jork.

(14) Rozdział B.34 niniejszego załącznika: 'Badanie toksyczności reprodukcji jednego pokolenia'.

(15) Rozdział B.35 niniejszego załącznika: 'Dwupokoleniowe badanie toksyczności reprodukcyjnej'.

(16) Rozdział B.43 niniejszego załącznika: 'Badanie neurotoksyczności u gryzoni'.

(17) Rozdział B.31 niniejszego załącznika: 'Badanie przedurodzeniowej toksyczności rozwojowej'.

(18) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33.

(19) WHO (1986), *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals* (Environmental Health Criteria 60), Albany, Nowy Jork: World Health Organization Publications Center, USA. Dostępne na stronie: [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, Genewa. Dostępne na stronie: [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, Nowy Jork.

(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, s. 499–509.

(23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997), 'The rationale for culling of rodent litters', *Fundam. Appl. Toxicol.* 38, s. 2–6.

(24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977), 'Foot tattoo of neonatal mice', *Lab. Animal Sci.* 27, s. 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, s. 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, Waszyngton, 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, s. 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, s. 1–4.

(31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: 'Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A)'. Międzynarodowa konferencja ds. harmonizacji wymagań technicznych dla rejestracji produktów leczniczych stosowanych u ludzi.

(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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 298–303.

(38) Spear, L.P. (1990), 'Neurobehavioral assessment during the early postnatal period', *Neurotoxicol. Teratol.* 12, s. 489–95.

(39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975), 'Postnatal development of locomotion in the laboratory rat', *Anim. Behav.* 23, s. 896–920.

(40) Adams, J. (1986), 'Methods in Behavioral Teratology', [w:] *Handbook of Behavioral Teratology*, Riley, E.P., Vorhees, C.V. (red.) Plenum Press, Nowy Jork, s. 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, s. 53–66.

(42) Robbins, T.W. (1977), 'A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity', [w:] *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (red.) Plenum Press, Nowy Jork, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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 r., s. 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, s. 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, s. 589–591.

(49) Davis, M. (1984), 'The mammalian startle response', [w:] *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (red.), Plenum Press, Nowy Jork, s. 287–351.

(50) Koch, M. (1999), 'The neurobiology of startle', *Prog. Neurobiol.* 59, s. 107–128.

(51) Crofton, K.M. (1992), 'Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction', [w:] *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (red.). Raven Press, Nowy Jork, s. 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, s. 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, s. 25–30.

(54) Ison, J.R. (1984), 'Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure', *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 6, s. 437–445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992), 'Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes', [w:] *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (red.), Raven Press, Nowy Jork. s. 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, s. 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, s. 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, s. 237–244.

(59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989), 'Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat', *Behav. Neurosci.* 103, s. 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, s. 465–479.

(61) Morris, R. (1984), 'Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat', *J. Neurosci. Methods* 11, s. 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, s. 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, s. 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, s. 235–241.

(65) Vorhees, C.V. (1997), 'Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins', *Drug Chem. Toxicol.* 20, s. 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, s. 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, s. 342–352.

(68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981), 'Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding', *J. Gerontol.* 36, s. 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, s. 122–131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994), *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Waszyngton, DC, s. 84–107.

(71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002), *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, Londyn.

▼**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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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. (2005a), 'Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives', *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, s. 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. (2005b), '2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity', *Reprod. Toxicol*. 20, s. 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, s. 129–135.

(79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998), *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, Nowy Jork.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998), 'Stereology: A practical primer for neuropathology', J. *Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, s. 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, s. 262–268.

(82) Schmitz, C. (1997), 'Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology', *J. Neurocytol.* 26, s. 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, s. 51–61.

(84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005), 'Design-based stereology in neuroscience', *Neuroscience* 130, s. 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, s. 113–121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995), 'Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum', *Develop. Brain Res.* 84, s. 294–298.

(87) Jensen KF, Catalano SM. (1998), 'Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology', [w:] *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (red.), Academic Press, Nowy Jork, s. 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, s. 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, s. 1056–1060.

(90) Friede, R. L. (1989), *Developmental Neuropathology*, wydanie drugie, 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, s. 127–133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996), 'Setting exposure standards: a decision process', *Environ. Health Perspect.* 104, s. 401–405.

(93) US EPA (2005), Guidelines for Carcinogen Risk Assessment US EPA NCEA-F-0644 A.

(94) US EPA (1996), Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.

(95) Duńska Agencja Ochrony Środowiska (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, s. 113–126.

(97) Gad, S.C. (1989), 'Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology', *J. Am. Coll. Toxicol.* 8, s. 21–27.

(98) Abby, H., Howard, E. (1973), 'Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring', *Dev. Psychobiol.* 6, s. 329–335.

(99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975), 'Selection of the experimental unit in teratology studies', *Teratology* 12, s. 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, s. 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, s. 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, s. 345–352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., oraz grupa robocza *ad hoc* STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006), 'A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today', *Toxicol. Pathol.* 34, s. 296–313.

(104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992), 'The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies', *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3), s. 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, s. 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), s. 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), s. 288–325.

▼**M5**

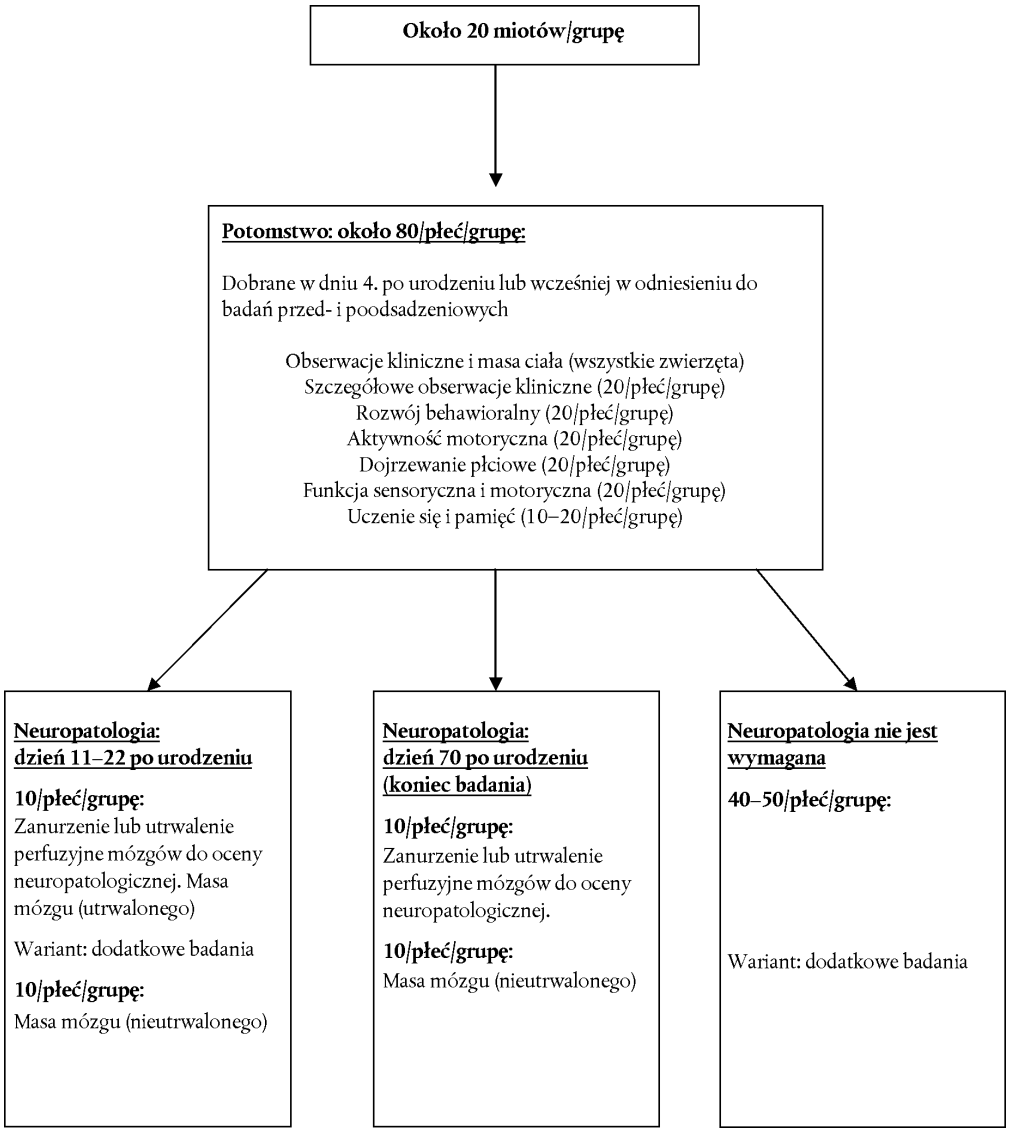
(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008), ‘Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints’, *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), s. 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), s. 349–381.

▼M5

Rysunek 1

Ogólny schemat badań w odniesieniu do badań behawioralnych/funkcjonalnych, oceny neuropatologicznej i mas mózgów. Poniższy diagram jest oparty na opisach z pkt 13–15. Przykłady przydzielania zwierząt znajdują się w dodatku 1.



▼M5

Dodatek 1

1. Poniżej opisano i przedstawiono w formie tabeli przykłady ewentualnych przydziałów. Przykłady te mają na celu ukazać, że przydział zwierząt objętych badaniem do różnych modeli badania może przebiegać na wiele sposobów.

Przykład 1

2. Do badania rozwoju zachowań w okresie przedodsadzeniowym wykorzystuje się grupę 20 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot). Spośród tych zwierząt 10 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) jest uśmiercanych w sposób humanitarny w dniu 22 po urodzeniu. Ich mózgi są usuwane, ważone i przetwarzane do oceny histopatologicznej. Poza tym gromadzi się dane dotyczące masy mózgu, stosując nieutrwalone mózgi pozostałych 10 samców i 10 samic na dawkę.

3. Kolejną grupę 20 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot) wykorzystuje się do badań funkcjonalnych/behawioralnych w okresie poodsadzeniowym (szczegółowych obserwacji klinicznych, aktywności ruchowej, reakcji na nagły dźwięk i badania funkcji poznawczej u zwierząt w okresie dojrzewania) i oceny wieku dojrzewania płciowego. Spośród tych osobników 10 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) zostaje znieczulonych i utrwalonych przez perfuzję na koniec badania (około dnia 70 po urodzeniu). Po dodatkowym utrwaleniu *in situ* usuwa się mózg i przetwarza się go w celu oceny neuropatologicznej.

4. W badaniu funkcji poznawczej u młodych dorosłych (np. dzień 60–70 po urodzeniu) wykorzystuje się trzecią grupę 20 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot). Spośród tych osobników 10 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) zostaje uśmierconych na koniec badania, a ich mózgi są usuwane i ważone.

5. Pozostałe 20 zwierząt/płeć/grupę zachowuje się do możliwych dodatkowych badań.

Tabela 1

Nr młodego ([a])		Liczba młodych przydzielonych do badania	Badanie
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Rozwój zachowań
		10 m + 10 f	Masa mózgu/neuropatologia/ morfometria w dniu 22 po urodzeniu
		10 m + 10 f	Masa mózgu w dniu 22 po urodzeniu
2	6	20 m + 20 f	Szczegółowe obserwacje kliniczne
		20 m + 20 f	Aktywność ruchowa
		20 m + 20 f	Dojrzałość płciowa
		20 m + 20 f	Funkcje motoryczno-sensoryczne
		20 m + 20 f	Uczenie się i pamięć (dzień 25 po urodzeniu)
		10 m + 10 f	Masa mózgu/neuropatologia/ morfometria młodego dorosłego w dniu 70 po urodzeniu

▼**M5**

Nr młodego (a)		Liczba młodych przydzielonych do badania	Badanie
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Uczenie się i pamięć (młode dorosłe)
		10 m + 10 f	Masa mózgu młodego dorosłego w dniu 70 po urodzeniu
4	8	—	Zatrzymanie zwierząt w celu wymiany lub w celu dodatkowych badań

(a) W tym przykładzie mioty zostały ograniczone do 4 samców (m) + 4 samic (f); młode samce oznaczono numerami od 1 do 4, a młode samice od 5 do 8.

Przykład 2

6. Do badania rozwoju zachowań w okresie przedodsadzeniowym wykorzystuje się grupę 20 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot). Spośród tych zwierząt 10 młodych/płeć/dawkę (1 samiec lub 1 samica na miot) jest uśmiercanych w sposób humanitarny w dniu 11 po urodzeniu. Ich mózgi są usuwane, ważone i przetwarzane do oceny histopatologicznej.

7. Inną grupę 20 zwierząt/płeć/dawkę (1 samiec i 1 samica na miot) wykorzystuje się do badań po odsadzeniu (szczegółowych obserwacji klinicznych, aktywności ruchowej, oceny wieku dojrzewania płciowego oraz funkcji motoryczno-sensorycznych). Spośród tych osobników 10 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) zostaje znieczulonych i utrwalonych przez perfuzję na koniec badania (około dnia 70 po urodzeniu). Po dodatkowym utrwaleniu *in situ* usuwa się mózg, waży się go i przetwarza w celu oceny neuropatologicznej.

8. W badaniu funkcji poznawczej u osobników dojrzewających i młodych dorosłych wykorzystuje się 10 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samca lub 1 samicę na miot). Do celów badań funkcji poznawczej w dniu 23 po urodzeniu i u młodych dorosłych wykorzystuje się inne zwierzęta. Na koniec badania 10 zwierząt/płeć/grupę objętych badaniem jako dorosłe zostaje uśmierconych, a ich mózgi są usuwane i ważone.

9. Pozostałe 20 zwierząt/płeć/grupę niewybranych do badań uśmierca się i utylizuje przy odsadzaniu.

Tabela 2

Nr młodego (a)		Liczba młodych przydzielonych do badania	Badanie
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Rozwój zachowań
		10 m + 10 f	Masa mózgu/neuropatologia/morfometria w dniu 11 po urodzeniu
2	6	20 m + 20 f	Szczegółowe obserwacje kliniczne
		20 m + 20 f	Aktywność ruchowa
		20 m + 20 f	Dojrzałość płciowa
		20 m + 20 f	Funkcje motoryczno-sensoryczne
		10 m + 10 f	Masa mózgu/neuropatologia/morfometria młodego dorosłego w dniu 70 po urodzeniu

▼M5

Nr młodego (a)		Liczba młodych przydzielonych do badania	Badanie
m	f		
3	7	10 m + 10 f (b)	Uczenie się i pamięć (dzień 23 po urodzeniu)
3	7	10 m + 10 f (b)	Uczenie się i pamięć (młode dorosłe) Masa mózgu młodego dorosłego
4	8	—	Zwierzęta uśmiercone i zutylizowane w dniu 21 po urodzeniu

(a) W tym przykładzie mioty zostały ograniczone do 4 samców (m) + 4 samic (f); młode samce oznaczono numerami od 1 do 4, a młode samice od 5 do 8.
(b) Do celów badań funkcji poznawczej w dniu 23 po urodzeniu i u młodych dorosłych wykorzystuje się różne młode (np. parzyste/nieparzyste mioty z całkowitej liczby 20 miotów).

Przykład 3

10. Do celów pomiaru masy mózgu i oceny neuropatologicznej w dniu 11 po urodzeniu wykorzystuje się grupę 20 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot). Spośród tych zwierząt 10 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) zostaje uśmierconych w sposób humanitarny w dniu 11 po urodzeniu, a ich mózgi są usuwane, ważone i przetwarzane do oceny histopatologicznej. Poza tym gromadzi się dane dotyczące masy mózgu, stosując nieutrwalone mózgi pozostałych 10 samców i 10 samic na dawkę.

11. Kolejną grupę 20 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot) wykorzystuje się do celów badania rozwoju zachowań (aktywności ruchowej), badań w okresie po odsadzeniu (aktywności ruchowej i oceny wieku dojrzewania płciowego) i badania funkcji poznawczej u osobników dojrzewających.

12. Następną grupę 20 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot) wykorzystuje się do celów badania funkcji motoryczno-sensorycznych (reakcja na nagły dźwięk) i szczegółowych obserwacji klinicznych. Spośród tych osobników 10 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) zostaje znieczulonych i utrwalonych przez perfuzję na koniec badania (około dnia 70 po urodzeniu). Po dodatkowym utrwaleniu *in situ* usuwa się mózg, waży się go i przetwarza w celu oceny neuropatologicznej.

13. Do badania funkcji poznawczej u młodych dorosłych wykorzystuje się inną grupę 20 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot). Spośród nich 10 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) zostaje uśmierconych na koniec badania, a ich mózgi są usuwane i ważone.

Tabela 3

Nr młodego (a)		Liczba młodych przydzielonych do badania	Badanie
m	f		
1	5	10 m + 10 f	Masa mózgu/neuropatologia/morfometria w dniu 11 po urodzeniu
		10 m + 10 f	Masa mózgu w dniu 11 po urodzeniu
2	6	20 m + 20 f	Rozwój zachowań (aktywność ruchowa)
		20 m + 20 f	Aktywność ruchowa
		20 m + 20 f	Dojrzewanie płciowe
		20 m + 20 f	Uczenie się i pamięć (dzień 27 po urodzeniu)

▼**M5**

Nr młodego [a]		Liczba młodych przydzielonych do badania	Badanie
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Reakcja na nagły dźwięk (osobniki dojrzewające i młode dorosłe)
		20 m + 20 f	Szczegółowe obserwacje kliniczne
		10 m + 10 f	Masa mózgu/neuropatologia/ morfometria młodego dorosłego w dniu 70 po urodzeniu
4	8	20 m + 20 f	Uczenie się i pamięć (młode dorosłe)
		10 m + 10 f	Masa mózgu młodego dorosłego

[a] W tym przykładzie mioty zostały ograniczone do 4 samców (m) + 4 samic (f); młode samce oznaczono numerami od 1 do 4, a młode samice od 5 do 8.

▼**M5**

Dodatek 2

Definicje:

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

▼M5

B.54. **TEST BIOLOGICZNY WZROSTU MACICY U GRYZONI: KRÓTKOTERMINOWE BADANIE PRZESIEWOWE WŁAŚCIWOŚCI ESTROGENNYCH**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest zgodna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 440 (2007 r.). W 1998 r. OECD podjęła działania o wysokim priorytecie, mające na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych na potrzeby badań przesiewowych i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (1). Jednym z elementów tych działań było opracowanie wytycznych dotyczących biologicznego testu wzrostu macicy u gryzoni. Test biologiczny wzrostu macicy u gryzoni był następnie przedmiotem rozszerzonego programu walidacyjnego, obejmującego sporządzenie szczegółowego dokumentu ramowego (2)(3) i przeprowadzenie obszernych wewnątrz- i międzylaboratoryjnych badań celem wykazania istotności i odtwarzalności testu biologicznego przy użyciu silnego estrogenu referencyjnego, słabych agonistów receptorów estrogenowych, silnego antagonisty receptorów estrogenowych oraz negatywnej chemicznej substancji odniesienia (4)(5)(6)(7)(8)(9). Przedmiotowa metoda badawcza B.54 została opracowana w oparciu o doświadczenia zdobyte w trakcie programu badań walidacyjnych i wyniki otrzymane za pomocą agonistów estrogennych w ramach tego programu.

2. Test biologiczny wzrostu macicy jest krótkoterminowym badaniem przesiewowym, zapoczątkowanym w latach 30. ubiegłego wieku (27)(28); po raz pierwszy został poddany standaryzacji w odniesieniu do badań przesiewowych przez komitet ekspertów w 1962 r. (32)(35). Test ten polega na zwiększeniu masy macicy lub reakcji polegającej na zwiększeniu masy macicy (w celu dokonania przeglądu zob. pkt 29). Test pozwala dokonać oceny zdolności substancji chemicznej do wywoływania aktywności biologicznej zgodnej z aktywnością agonistów i antagonistów naturalnych estrogenów (np. estradiolu 17-beta), jednak jest znacznie rzadziej wykorzystywany do wykrywania antagonistów niż do wykrywania agonistów. Macica reaguje na estrogeny na dwa sposoby. Wstępną reakcją jest wzrost masy w związku z imbibicją wody. Następnie dochodzi do przyrostu masy w związku ze rozrostem tkanki (30). Reakcje macicy u szczurów i myszy są porównywalne pod względem jakościowym.

3. Przedmiotowy test pełni rolę badania przesiewowego *in vivo* i jego stosowanie należy postrzegać w kontekście ram koncepcyjnych OECD w zakresie badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego („OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals”) (dodatek 2). W powyższych ramach koncepcyjnych test biologiczny wzrostu macicy przypisano do poziomu 3 jako test *in vivo* pozwalający uzyskać dane dotyczące pojedynczego mechanizmu układu hormonalnego, tj. estrogenności.

4. Biologiczny test wzrostu macicy ma zostać włączony do zestawu badań *in vitro* i *in vivo* w celu identyfikacji substancji chemicznych, które mogą wchodzić w interakcje z układem hormonalnym, co ostatecznie doprowadzi do oceny ryzyka w odniesieniu do zdrowia ludzi i środowiska. W programie walidacyjnym OECD zastosowano zarówno silnych, jak i słabych agonistów estrogenu, aby ocenić skuteczność testu pod względem identyfikacji estrogennych substancji chemicznych (4)(5)(6)(7)(8). W ten sposób oprócz wykazania dobrej odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej doskonale wykazano także czułość procedury badawczej dla agonistów estrogenu.

5. Jeżeli chodzi o negatywne związki chemiczne, do programu walidacyjnego włączono zaledwie jedną „negatywną” chemiczną substancję odniesienia, w stosunku do której zgłoszono wynik negatywny w biologicznym teście wzrostu macicy, jak również w wiązaniu receptorowym *in vitro*, ale oceniono dodatkowe dane z badań niepowiązane z programem walidacyjnym OECD, przedstawiając dalsze dowody na swoistość biologicznego testu wzrostu macicy w odniesieniu do badań przesiewowych agonistów estrogenu (16).

▼M5

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

6. Agoniści i antagoniści estrogenu działają jako ligandy w stosunku do receptorów estrogenowych a i b i mogą, odpowiednio, aktywować lub hamować działanie transkrypcyjne receptorów. Może powodować to niepożądane zagrożenia dla zdrowia, w tym wpływ na reprodukcję i rozwój. W związku z tym istnieje potrzeba dokonania oceny i zbadania substancji chemicznej jako potencjalnego agonisty lub antagonisty estrogenu. Powinowactwo ligandu wobec receptora estrogenu lub aktywacja transkrypcji genów reporterowych *in vitro*, mimo swojej wartości informacyjnej, stanowi tylko jeden z szeregu determinantów potencjalnego zagrożenia. Pozostałe determinanty mogą obejmować aktywację i dezaktywację metaboliczną w momencie dostania się do organizmu, dystrybucję do tkanek docelowych i klirens z organizmu, co najmniej częściowo w zależności od drogi podawania i badanej substancji chemicznej. Prowadzi to do konieczności przeprowadzenia badań *in vivo* ewentualnego działania substancji chemicznej w odpowiednich warunkach, chyba że odpowiednie informacje można już wywnioskować z właściwości danej substancji chemicznej w odniesieniu do wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania. Reakcją tkanek macicy na stymulację estrogenami jest nagły i silny wzrost, w szczególności u gryzoni laboratoryjnych, w przypadku których cykl estrogenowy trwa około 4 dni. Gryzonie, a w szczególności szczury, wykorzystuje się także powszechnie w badaniach toksyczności do celów charakteryzowania zagrożeń. W związku z tym macica gryzoni jest odpowiednim organem docelowym wykorzystywanym do celów badań przesiewowych *in vivo* dotyczących agonistów i antagonistów estrogenu.

7. Przedmiotową metodę badawczą opracowano w oparciu o protokoły wykorzystywane w badaniu walidacyjnym OECD, które okazały się być wiarygodne i powtarzalne w badaniach wewnątrz- i międzylaboratoryjnych (5)(7). Obecnie dostępne są dwie metody, a mianowicie wykorzystywanie dorosłych samic poddanych owariektomii (metoda badania dorosłych osobników poddanych owariektomii) i wykorzystywanie niedojrzałych osobników niepoddanych owariektomii (metoda badania młodych osobników). W przypadku obu metod, w ramach programu walidacyjnego OECD, wykazano porównywalną czułość i odtwarzalność. Metoda badania niedojrzałych osobników jest jednak w pewnym stopniu mniej szczegółowa, ponieważ posiadają one nienaruszoną oś podwzgórze–przysadka–gonady (HPG), ale obejmuje szerszy zakres badania niż metoda badania zwierzęcia poddanego owariektomii, ponieważ zwierzę niedojrzałe może reagować na substancje chemiczne, które wchodzą w interakcje z osią podwzgórze–przysadka–gonady, a nie tylko z receptorem estrogenu. W przypadku szczurów oś podwzgórze–przysadka–gonady staje się funkcjonalna w wieku około 15 dni. Zanim to nastąpi, nie można przyspieszyć momentu osiągnięcia przez zwierzę dojrzałości płciowej, podając mu na przykład gonadoliberynę (GnRH). W momencie osiągania przez samice dojrzałości płciowej, jeszcze przed otwarciem pochwy, u samicy wystąpi szereg cykli bezowulacyjnych, w wyniku których nie dojdzie do otwarcia pochwy lub owulacji, ale zajdą pewne zmiany hormonalne. W przypadku gdy substancja chemiczna bezpośrednio lub pośrednio stymuluje oś podwzgórze–przysadka–gonady, następuje wczesne dojrzewanie, wczesna owulacja i przyspieszone otwarcie pochwy. Powodują to nie tylko substancje chemiczne oddziałujące na oś podwzgórze–przysadka–gonady, ale też niektóre pasze, zawierające wyższe poziomy metabolizowalnej energii niż pozostałe, będą stymulowały wzrost i przyspieszały otwarcie pochwy, nie posiadając przy tym właściwości estrogennych. Takie substancje chemiczne nie wywoływałyby reakcji wzrostu macicy u dorosłych zwierząt poddanych owariektomii, ponieważ w ich przypadku oś podwzgórze–przysadka–gonady nie funkcjonuje.

8. Ze względu na dobrostan zwierząt należy stosować przede wszystkim taką metodę, która polega na wykorzystaniu niedojrzałych szczurów, unikając wykonywania na zwierzętach wstępnych zabiegów chirurgicznych a także potencjalnego niewykorzystania tych zwierząt, które wykazują oznaki wejścia w cykl estrogenowy (zob. pkt 30).

▼M5

9. Reakcja wzrostu macicy nie jest wyłącznie pochodzenia estrogennego, tj. reakcję tę mogą powodować także substancje chemiczne inne niż agoniści lub antagoniści estrogenów. Przykładowo podawanie stosunkowo wysokich dawek progesteronu, testosteronu lub różnych progestagenów syntetycznych może prowadzić do reakcji stymulującej (30). Każda reakcja może być poddana analizie histologicznej, aby wykazać keratynizację i rogowacenie pochwy (30). Niezależnie od ewentualnej przyczyny reakcji uzyskanie dodatniego wyniku biologicznego testu wzrostu macicy powinno z reguły prowadzić do działań zmierzających do dalszych wyjaśnień. Dodatkowe dowody wskazujące na estrogenność mogą pochodzić z testów *in vitro*, takich jak testy wiązań receptora estrogenu i badania aktywacji transkrypcji, lub z innych testów *in vivo*, takich jak test dojrzałości płciowej samic.

10. Biorąc pod uwagę, że test biologiczny wzrostu macicy pełni rolę badania przesiewowego *in vivo*, przyjęte podejście walidacyjne uwzględniało zarówno dobrostan zwierząt, jak i wielopoziomową strategię badań. W tym celu główny nacisk kładziono na rygorystyczną walidację odtwarzalności i czułości w odniesieniu do estrogenności stanowiącej kluczową kwestię w odniesieniu do wielu substancji chemicznych, natomiast niewielką uwagę przywiązywano do kwestii dotyczącej antyestrogenności testu. Zbadano tylko jeden antyestrogen o silnym działaniu, ponieważ liczba substancji chemicznych o wyraźnym profilu antyestrogennym (niezakłóconym przez aktywność estrogenową) jest bardzo ograniczona. W związku z tym przedmiotowa metoda badawcza przeznaczona jest dla protokołu estrogennego, natomiast protokół opisujący tryb testu dotyczący antagonistów zawarto w wytycznych (37). Odtwarzalność i czułość testu na obecność substancji chemicznych charakteryzujących się wyłącznie działaniem antyestrogennym zostanie doprecyzowana w dalszej kolejności, kiedy procedura badawcza będzie już przez jakiś czas stosowana rutynowo i zidentyfikowana zostanie większa liczba substancji chemicznych charakteryzujących się takim działaniem.

11. Uznano, że wszelkie procedury z wykorzystaniem zwierząt będą zgodne z lokalnymi normami w zakresie opieki nad zwierzętami; przedstawione poniżej opisy dotyczące opieki nad zwierzętami i ich traktowania stanowią minimalne standardy wykonywania badań i zostaną zastąpione przez lokalne przepisy, takie jak dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (38). OECD zapewnia dalsze wytyczne dotyczące humanitarnego traktowania zwierząt (25).

12. Podobnie jak w przypadku wszystkich testów, w których wykorzystuje się żywe zwierzęta, niezwykle istotne jest dopilnowanie przed rozpoczęciem testu, aby dane były faktycznie potrzebne. Przykładowo dwie sytuacje, w których dane takie mogą być wymagane, to:

— wysokie prawdopodobieństwo narażenia (poziom 1 ram koncepcyjnych, dodatek 2) lub prawdopodobieństwo estrogenności (poziom 2) w celu zbadania, czy takie działania mogą wystąpić *in vivo*,

— działania wskazujące na estrogenność na poziomie 4 lub 5 badania *in vivo* w celu uzasadnienia, że działania te były związane z mechanizmem estrogennym, który nie mógłby zostać wyjaśniony za pomocą badania *in vitro*.

13. Definicje stosowane w tej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

▼M5

ZASADA BADANIA

14. Test biologiczny wzrostu macicy w odniesieniu do swojej czułości opiera się na systemie badań na zwierzętach, u których oś podwzgórze-przysadka-jajnik nie funkcjonuje, co prowadzi do niskich endogennych poziomów cyrkulacji estrogenu. Zapewni to niską początkowa masę macicy i maksymalny zakres reakcji na podawane estrogeny. Następujące dwa stany wrażliwości na estrogeny u samic gryzoni spełniają ten wymóg:

(i) niedojrzałe samice po odsadzeniu i przed osiągnięciem dojrzałości płciowej; oraz

(ii) młode dojrzałe samice poddane owariektomii, u których zapewniono odpowiedni czas na regresję tkanek macicy.

15. Badaną substancję chemiczną podaje się codziennie przez sondę drogą doustną lub przez podskórne wstrzyknięcie. Stopniowane dawki badanej substancji chemicznej podaje się co najmniej dwóm grupom badanych (w celu uzyskania wskazówek zob. pkt 33) zwierząt doświadczalnych, stosując taką samą dawkę w każdej grupie i okres podawania wynoszący trzy kolejne dni w odniesieniu do metody badania osobników niedojrzałych oraz okres podawania wynoszący co najmniej trzy kolejne dni w odniesieniu do metody badania dorosłych osobników poddanych owariektomii. Zwierzęta poddaje się sekcji po upływie około 24 godzin od podania ostatniej dawki. W przypadku agonistów estrogenu szacuje się średnią masę macicy badanych grup zwierząt w odniesieniu do grupy kontrolnej nośnika w celu wykrycia istotnych statystycznie wzrostów. Statystycznie istotny wzrost średniej masy macicy w grupie badanej wskazuje na dodatnią reakcję będącą wynikiem tego testu biologicznego.

OPIS METODY BADAWCZEJ

Wybór gatunków zwierząt

16. Do badań wykorzystuje się powszechnie stosowane laboratoryjne szczepy gryzoni. Przykładowo podczas walidacji wykorzystano szczury szczepu Sprague-Dawley i Wistar. Nie należy wykorzystywać szczepów, w przypadku których stwierdzono lub podejrzewa się, że macice zwierząt mają mniejszą zdolność do wykazywania reakcji. Laboratorium powinno wykazać czułość wykorzystywanego szczepu zgodnie z opisem w punktach 26 i 27.

17. Szczury i myszy wykorzystywano do celów biologicznego testu wzrostu macicy od lat 30. ubiegłego stulecia. Badania walidacyjne OECD przeprowadzano jedynie u szczurów, opierając się na założeniu, że oba gatunki powinny być równoważne, w związku z tym jeden gatunek powinien wystarczyć do przeprowadzenia ogólnoświatowej walidacji dla oszczędzenia zasobów i zwierząt. Szczur jest gatunkiem preferowanym w przypadku większości badań toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej. Biorąc pod uwagę, że istnieje obszerna historyczna baza danych dotyczących myszy, przeprowadzono ograniczone uzupełniające badanie walidacyjne na tym gatunku w celu rozszerzenia zakresu metody testu biologicznego wzrostu macicy w odniesieniu do gryzoni na myszy jako gatunek eksperymentalny (16). Zgodnie z pierwotnym zamiarem oszczędzania zasobów i zwierząt wybrano stosowanie podejścia pomostowego polegającego na wykorzystywaniu ograniczonej liczby badanych substancji chemicznych, ograniczonej liczbie uczestniczących laboratoriów i nieprzeprowadzaniu badań kodowanych próbek. Przedmiotowe pomostowe badanie walidacyjne wykazało w odniesieniu do biologicznego testu wzrostu macicy u młodych dojrzałych myszy poddanych owariektomii, że dane otrzymane w przypadku szczurów i myszy odpowiadają sobie nawzajem pod względem jakościowym i ilościowym. W przypadkach, w których wynik biologicznego testu wzrostu macicy może poprzedzić badanie długoterminowe, możliwe jest wykorzystanie w obu badaniach zwierząt tego samego szczepu i pochodzących z tego samego źródła. Podejście pomostowe ograniczono do myszy poddanych owariektomii, a sprawozdanie nie zapewnia solidnego zbioru danych, aby dokonać walidacji modelu badań niedojrzałych osobników, w związku z czym model ten nie jest objęty zakresem bieżącej metody badawczej.

▼M5

18. W związku z tym w niektórych przypadkach dopuszcza się wykorzystywanie myszy zamiast szczurów. Należy uzasadnić wykorzystanie tego gatunku w oparciu o kryteria toksykologiczne, farmakokinetyczne lub inne. W przypadku myszy może zajść konieczność modyfikacji protokołu. Przykładowo spożycie pokarmu przez myszy określane na podstawie masy ciała jest wyższe niż u szczurów, w związku z czym zawartość fitoestrogenów w karmie podawanej myszom powinna być niższa niż w karmie podawanej szczurom (9)(20)(22).

Warunki trzymania i żywienia

19. Wszystkie procedury powinny być zgodne z lokalnymi normami w zakresie opieki nad zwierzętami w warunkach laboratoryjnych. Opisy dotyczące opieki nad zwierzętami i ich traktowania stanowią minimalne normy i zostaną zastąpione przez lokalne przepisy, takie jak dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (38). Temperatura w pomieszczeniu ze zwierzętami doświadczalnymi powinna wynosić 22 °C (w przybliżeniu z tolerancją ± 3 °C). Wilgotność względna, poza okresem czyszczenia pomieszczenia, powinna wynosić co najmniej 30 % i nie przekraczać 70 %. Wilgotność względną należy docelowo utrzymywać w granicach 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu dziennym 12 godzin światła, 12 godzin ciemności.

20. Należy zapewnić paszę laboratoryjną i wodę pitną *ad libitum.* Młode dorosłe zwierzęta mogą być trzymane pojedynczo lub umieszczane w klatkach w grupach o liczebności nieprzekraczającej trzech zwierząt. Z uwagi na młody wiek niedojrzałych zwierząt zaleca się trzymanie ich w grupach społecznych.

21. Stwierdzono, że wysoka zawartość fitoestrogenów w paszach laboratoryjnych zwiększa masę macicy u gryzoni w stopniu wystarczającym, by zakłócało to wyniki biologicznego testu wzrostu macicy (13)(14)(15). Wysokie poziomy fitoestrogenów i metabolizowalnej energii w paszach laboratoryjnych mogą powodować także wczesne dojrzewanie płciowe w przypadkach, w których wykorzystuje się zwierzęta niedojrzałe. Obecność fitoestrogenów wynika przede wszystkim z dodawania wyrobów z soi i lucerny do pasz laboratoryjnych, a do tego wykazano, że partie standardowych pasz laboratoryjnych różnią się między sobą pod względem stężenia fitoestrogenów (23). Istotną zmienną jest masa ciała, ponieważ ilość spożywanego pokarmu ma związek z masą ciała. W związku z tym rzeczywista dawka spożywanych fitoestrogenów z tej samej paszy może różnić się między gatunkami i w zależności od wieku (9). W przypadku niedojrzałych samic szczurów spożycie pokarmu określane na podstawie masy ciała może być prawie dwa razy większe niż w przypadku młodych dorosłych samic poddanych owariektomii. W przypadku młodych dorosłych samic myszy spożycie pokarmu określane na podstawie masy ciała może być prawie cztery razy większe niż w przypadku młodych dorosłych samic szczurów poddanych owariektomii.

22. Wyniki biologicznego testu wzrostu macicy (9)(17)(18)(19) wykazują jednak, że ograniczone ilości fitoestrogenów w paszy są dopuszczalne i nie powodują obniżenia czułości testu biologicznego. Orientacyjnie zawartość fitoestrogenów nie powinna przekraczać 350 µg odpowiedników genisteiny/gram paszy laboratoryjnej w przypadku niedojrzałych samic szczurów szczepów Sprague Dawley i Wistar (6)(9). Takie pasze powinny także mieć zastosowanie w przypadku badania młodych dorosłych szczurów poddanych owariektomii, ponieważ spożycie pokarmu w stosunku do masy ciała jest niższe w przypadku młodych dorosłych zwierząt niż w przypadku zwierząt niedojrzałych. Jeżeli planuje się wykorzystanie myszy poddanych owariektomii lub szczurów o zwiększonej wrażliwości na fitoestrogeny, należy rozważyć proporcjonalne obniżenie zawartości fitoestrogenów w paszy (20). Ponadto różnice w metabolizowalnej energii dostępnej w różnych paszach mogą prowadzić do zmian czasowych w osiąganiu dojrzałości płciowej (21)(22).

▼M5

23. Przed przeprowadzeniem badania wymagany jest ostrożny wybór paszy niezawierającej podwyższonego poziomu fitoestrogenów (aby uzyskać wytyczne zob. (6)(9)) lub metabolizowalnej energii, które mogą zakłócić wyniki (15)(17)(19)(22)(36). Zapewnienie właściwej wydajności systemu badań wykorzystywanego przez laboratorium, zgodnie z punktem 26 i 27, jest istotnym elementem sprawdzającym oba te czynniki. W ramach zabezpieczenia zgodnie z dobrą praktyką laboratoryjną (DPL) należy pobrać reprezentatywną próbkę spośród każdej serii paszy podawanej w trakcie badania w celu przeprowadzenia ewentualnej analizy zawartości fitoestrogenów (np. w przypadku wysokiej masy macicy osobników kontrolnych w stosunku do historycznych danych dotyczących osobników kontrolnych lub w przypadku wystąpienia nieodpowiedniej reakcji na estrogen referencyjny, tj. etynyloestradiol 17-alfa). Należy przeprowadzić analizę podwielokrotności próbek w trakcie badania lub po zamrożeniu w temperaturze – 20 °C, bądź też w sposób pozwalający na zapobieżenie rozkładowi próbki przed poddaniem jej analizie.

24. Niektóre materiały ściółkowe mogą zawierać naturalnie występujące chemiczne substancje estrogenowe lub antyestrogenowe (np. wiadomo, że kolba kukurydzy wpływa na cykliczność u szczurów i wydaje się mieć działanie antyestrogenne). Wybrany materiał ściółkowy powinien zawierać możliwie jak najniższy poziom fitoestrogenów.

Przygotowanie zwierząt

25. Zwierzęta doświadczalne niewykazujące żadnych oznak choroby lub wad fizycznych są losowo przydzielane do grup kontrolnych i grup badanych. Klatki powinny być ustawione w taki sposób, żeby zminimalizować możliwy wpływ położenia klatki. Zwierzęta należy identyfikować pojedynczo. Preferuje się, aby niedojrzałe zwierzęta trzymane były w klatkach z matkami lub matkami zastępczymi do momentu odsadzenia podczas aklimatyzacji. Okres aklimatyzacji przed rozpoczęciem badania powinien trwać około 5 dni w odniesieniu do młodych dorosłych zwierząt i zwierząt niedojrzałych trzymanych z matkami lub matkami zastępczymi. W przypadkach, w których niedojrzałe zwierzęta dostarczono jako młode odsadzone bez matek, konieczne może być zastosowanie krótszego czasu trwania okresu aklimatyzacji, ponieważ dawkowanie należy rozpocząć natychmiast po odsadzeniu (zob. pkt 29).

PROCEDURA

Weryfikacja biegłości laboratorium

26. W celu dokonania weryfikacji biegłości laboratorium można zastosować następujące dwa warianty:

— weryfikację okresową, polegając na wstępnym badaniu początkowym dodatniej kontroli (zob. punkt 27). Co najmniej raz na 6 miesięcy i za każdym razem, gdy wykaże się zmianę mogącą mieć wpływ na wydajność testu (np. w przypadku nowej postaci paszy, zmiany pracowników przeprowadzających sekcje, zmiany szczepu zwierząt lub dostawcy itd.), zdolność reakcji systemu badań (modelu zwierzęcego) powinna być weryfikowana przy użyciu odpowiedniej dawki (w oparciu o badanie początkowe dodatniej kontrolni omówione w pkt 27) estrogenu referencyjnego, tj. etynyloestradiolu 17-alfa (nr CAS 57-63-6) (EE),

— zastosowanie równoległych kontroli poprzez włączenie grupy, w której podano odpowiednią dawkę estrogenu referencyjnego w każdym teście.

Jeżeli system nie wykaże oczekiwanej reakcji, należy zbadać warunki doświadczalne i w odpowiedni sposób je zmodyfikować. Zaleca się, aby stosowana dawka estrogenu referencyjnego w przypadku obu wariantów wynosiła około ED70–80.

▼M5

27. **Początkowe badanie kontroli dodatniej** — zanim w laboratorium po raz pierwszy przeprowadzi się badanie w ramach tej metody badawczej, należy wykazać biegłość laboratorium poprzez zbadanie zdolności do reakcji modelu zwierzęcego w drodze ustalenia reakcji na dawkę estrogenu referencyjnego: etynyloestradiolu 17-alfa (nr CAS 57-63-6) (EE), stosując co najmniej cztery dawki. Reakcja dotycząca masy macicy zostanie porównana z określonymi danymi historycznymi (zob. pozycja bibliografii nr (5)). W przypadku gdy powyższe początkowe badanie kontroli dodatniej nie przyniesie oczekiwanych wyników, należy zbadać warunki doświadczalne i je zmodyfikować.

Liczba i stan zwierząt

28. Każda badana i kontrolna grupa powinna zawierać co najmniej 6 zwierząt (zarówno w odniesieniu do protokołu metody badania osobników niedojrzałych, jak i dorosłych osobników poddanych owariektomii).

Wiek niedojrzałych zwierząt

29. W przypadku biologicznego testu wzrostu macicy przeprowadzanego na niedojrzałych zwierzętach należy dokładnie określić dzień ich narodzin. Dawkowanie należy rozpocząć wystarczająco wcześnie celem zapewnienia, by na zakończenie podawania badanej substancji chemicznej nie wystąpił jeszcze fizjologiczny wzrost endogennych estrogenów towarzyszących dojrzałości płciowej. Istnieją natomiast dowody wskazujące na fakt, że młode zwierzęta mogą być mniej wrażliwe. W celu określenia optymalnego wieku każde laboratorium powinno wziąć pod uwagę swoje własne podstawowe dane dotyczące dojrzałości.

Jako ogólna wytyczna dawkowanie u szczurów można rozpocząć natychmiast po wczesnym odsadzeniu w dniu 18 po urodzeniu (przy czym dniem narodzin jest dzień 0). Preferowanym dniem zakończenia dawkowania u szczurów jest dzień 21 po urodzeniu, jednak w każdym przypadku dawkowanie należy zakończyć przed dniem 25 po urodzeniu, ponieważ po przekroczeniu tego wieku oś podwzgórze-przysadka-jajnik staje się funkcjonalna oraz może nastąpić wzrost poziomu endogennego estrogenu, a co za tym idzie wzrost podstawowych średnich mas macic i wzrost w grupowych odchyleniach standardowych (2)(3)(10)(11)(12).

Procedura wycięcia jajników

30. W przypadku samic szczurów i myszy poddanych owariektomii (w grupie badanej i kontrolnej), owariektomia powinna być wykonana w 6–8 tygodniu życia. W przypadku szczurów od momentu przeprowadzenia owariektomii do pierwszego dnia dawkowania powinno upłynąć co najmniej 14 dni, aby umożliwić regres macicy do minimalnego, stabilnego poziomu podstawowego. W przypadku myszy od momentu przeprowadzenia owariektomii do pierwszego dnia dawkowania powinno upłynąć co najmniej 7 dni. Ponieważ wystarczają niewielkie ilości tkanki jajnikowej, aby wytwarzać znaczne stężenia estrogenów (3), przed ich wykorzystaniem należy poddać zwierzęta badaniu polegającym na obserwacji komórek nabłonkowych pobieranych z pochwy przez co najmniej pięć kolejnych dni (np. w dniach 10–14 po przeprowadzeniu owariektomii w przypadku szczurów). Jeżeli u zwierząt występują jakiekolwiek oznaki wejścia w cykl owulacyjny, nie powinno się ich wykorzystywać do badań. Ponadto w trakcie sekcji należy zbadać pozostałości jajnikowe w celu uzyskania dowodów wskazujących na obecność tkanki jajnikowej. W przypadku wykrycia obecności tkanki jajnikowej zwierzęcia nie należy uwzględniać w obliczeniach (3).

31. Zabieg owariektomii rozpoczyna się po odpowiednim znieczuleniu zwierzęcia i ułożeniu go w pozycji leżącej na brzuchu. Nacięcie otwierające grzbietowo-boczną ścianę brzucha powinno być wykonane na długości około 1 cm w środkowym punkcie między dolną granicą żeber a grzebieniem biodrowym oraz kilka milimetrów w kierunku poprzecznym do bocznej granicy mięśnia lędźwiowego. Należy usunąć jajnik z jamy brzusznej i przenieść go do aseptycznego pojemnika. Jajnik należy odciąć na połączeniu jajowodu z trzonem macicy. Po stwierdzeniu, że nie wystąpiło znaczne krwawienie, należy zamknąć ścianę brzucha poprzez założenie szwu oraz zamknąć skórę klipsami lub użyć odpowiedniego szwu. Punkty podwiązania przedstawiono schematycznie na rys 1. Zgodnie z zaleceniem lekarza weterynarii posiadającego doświadczenie w opiece nad gryzoniami należy zastosować pooperacyjną analgezję.

▼M5

Masa ciała

32. W przypadku metody badania poddanych owariektomii osobników dorosłych masa ciała i masa macicy nie są ze sobą skorelowane, ponieważ na masę macicy wpływ mają hormony, takie jak estrogeny, a nie czynniki wzrostowe regulujące masę ciała. Natomiast masa ciała jest powiązana z masą macicy w modelu badania niedojrzałych osobników w trakcie dojrzewania (34). Zatem na początku badania zróżnicowanie mas ciała u zwierząt wykorzystywanych w tym badaniu, w przypadku modelu badania niedojrzałych osobników, powinno być jak najmniejsze i nie powinno przekraczać ± 20 % średniej masy. Oznacza to, że liczebność miotu powinna być znormalizowana przez hodowcę, aby potomstwo różnych matek było karmione mniej więcej w takich samych ilościach. Zwierzęta należy przydzielić do grup (kontrolnych i badanych), stosując losowy rozkład mas, aby średnia masa ciała w każdej grupie nie różniła się statystycznie od średnich innych grup. Należy wziąć pod uwagę konieczność unikania w miarę możliwości umieszczania młodych z jednego miotu w tej samej grupie badanej, bez potrzeby zwiększania liczby miotów wykorzystywanych do celów badania.

Dawkowanie

33. W celu ustalenia, czy badana substancja chemiczna może mieć działanie estrogenne *in vivo,* zazwyczaj wystarczą dwie grupy dawkowania i jedna grupa kontrolna i takie rozwiązanie jest w związku z tym preferowane ze względu na dobrostan zwierząt. Jeżeli celem jest uzyskanie krzywej dawka-efekt lub ekstrapolacja do mniejszych dawek, potrzebne są co najmniej 3 grupy dawkowania. Jeżeli wymagane są informacje wykraczające poza identyfikację aktywności estrogennej (takie jak szacunki dotyczące aktywności), należy rozważyć zastosowanie innego schematu dawkowania. Z wyjątkiem podawania badanej substancji chemicznej, zwierzęta w grupie kontrolnej należy traktować w identyczny sposób jak zwierzęta w grupie badanej. Jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej jest stosowany nośnik, grupa kontrolna powinna otrzymać taką samą ilość nośnika, jakiej używa się w przypadku badanych grup (lub największą objętość nośnika, jaką użyto w przypadku badanych grup, jeżeli różni się ona między grupami).

34. W przypadku biologicznego testu wzrostu macicy celem jest dokonanie wyboru dawek, które zapewniają przeżycie zwierząt i które nie mają istotnego działania toksycznego lub nie powodują stresu u zwierząt po upływie trzech kolejnych dni podawania badanej substancji chemicznej w dawce nieprzekraczającej 1 000 mg/kg/dzień. Wszystkie dawki należy proponować i dobierać z uwzględnieniem wszelkich istniejących danych dotyczących toksyczności i danych (toksyko)kinetycznych dostępnych w odniesieniu do badanej substancji chemicznej lub powiązanych materiałów. W przypadku najwyższej dawki należy najpierw uwzględnić medialną dawkę śmiertelną (LD50) lub dane dotyczące ostrej toksyczności w celu uniknięcia śmierci, dotkliwego cierpienia i stresu zwierząt (24)(25)(26). Najwyższa dawka powinna odpowiadać maksymalnej tolerowanej dawce (MTD); badanie przeprowadzone z zastosowaniem dawki, która wywołała dodatnią reakcję wzrostu macicy, także byłoby dopuszczalne. W odniesieniu do badań przesiewowych zasadniczo dopuszczalne są duże odstępy pomiędzy kolejnym dawkowaniem (np. 0,5 jednostek logarytmicznych odpowiadających progresji dawki w wysokości 3,2 lub nawet do 1 jednostki logarytmicznej). W przypadku braku dostępności odpowiednich danych można przeprowadzić badanie ustalające zakres dawkowania, aby wspomóc określenie stosowanych dawek.

35. Ewentualnie, jeżeli aktywność estrogenną agonisty można oszacować na podstawie danych *in vitro* (lub *in silico*), dane te można uwzględnić przy doborze dawek. Przykładowo ilość badanej substancji chemicznej, która powodowałaby reakcje wzrostu macicy równoważne reakcji na agonistę odniesienia (etynyloestradiol), szacuje się na podstawie jej względnego oddziaływania *in vitro* na etynyloestradiol. Najwyższą dawkę badania otrzymano by poprzez pomnożenie tej analogicznej dawki przez odpowiedni współczynnik, np. 10 lub 100.

▼M5

Uwagi dotyczące ustalania zakresu dawkowania

36. W razie potrzeby można przeprowadzić badanie ustalające zakres dawkowania z wykorzystaniem kilku zwierząt. Pod tym względem można zastosować wytyczną OECD nr 19 (25), w której przedstawiono objawy kliniczne wskazujące na działanie toksyczne lub stres u zwierząt. Jeżeli w ramach tego badania ustalającego zakres dawkowania po trzech dniach podawania jest to wykonalne, macice mogą zostać wycięte i zważone po upływie około 24 godzin od ostatniej dawki. Dane te mogą następnie zostać wykorzystane, aby wspomóc główny projekt badania (wybór dopuszczalnej dawki maksymalnej i dopuszczalnych niższych dawek oraz zalecenie liczby grup dawkowania).

Podawanie dawek

37. Badaną substancję chemiczną podaje się drogą doustną przez sondę lub przez podskórne wstrzyknięcie. Podczas dokonywania wyboru drogi podawania należy brać pod uwagę względy dotyczące dobrostanu zwierząt oraz aspekty toksykologiczne, takie jak związek z drogą narażenia na substancję chemiczną u ludzi (np. drogą doustną przez sondę jako odpowiednik spożycia substancji, podskórne wstrzyknięcie jako odpowiednik inhalacji lub wchłaniania przez skórę), właściwości fizykochemiczne badanego materiału, a w szczególności istniejące informacje toksykologiczne i dane dotyczące metabolizmu i kinetyki (np. konieczność unikania efektu pierwszego przejścia, zwiększona efektywność na skutek podania substancji określoną drogą).

38. Zaleca się, o ile jest to możliwe, rozważenie użycia w pierwszej kolejności roztworu wodnego/zawiesiny wodnej. Ponieważ jednak większość ligandów estrogenów lub ich metabolicznych prekursorów najczęściej wykazuje właściwości hydrofobowe, powszechnie stosowanym podejściem jest zastosowanie roztworu/zawiesiny w oleju (np. kukurydzianym, z orzechów arachidowych, sezamowym lub w oliwie z oliwek). Oleje te charakteryzują się jednak różnymi wartościami energetycznymi i zawartościami tłuszczu, w związku z czym nośnik może mieć wpływ na pobranie całkowitej metabolizowalnej energii (ME), potencjalnie zmieniając przez to mierzone punkty końcowe, takie jak masa macicy, w szczególności w przypadku zastosowania metody badania niedojrzałych osobników (33). W związku z tym przed rozpoczęciem badania każdy nośnik, który ma być użyty, powinien zostać przebadany na grupie kontrolnej bez nośników. Badane substancje chemiczne można rozpuścić w minimalnej ilości 95-procentowego etanolu lub w innych odpowiednich rozpuszczalnikach i rozcieńczyć w badanym nośniku do uzyskania końcowych roboczych stężeń. Należy znać właściwości toksyczne rozpuszczalnika i zbadać je na oddzielnej grupie kontrolnej, w której zastosowano wyłącznie rozpuszczalnik. Jeżeli badana substancja chemiczna zostanie uznana za stabilną, można zastosować delikatne podgrzewanie i energiczne mechaniczne mieszanie w celu łatwiejszego rozpuszczenia badanej substancji chemicznej. Należy oznaczyć stabilność badanej substancji chemicznej w nośniku. Jeżeli badana substancja chemiczna jest stabilna przez cały okres trwania badania, można wtedy przygotować jedną początkową podwielokrotność badanej substancji chemicznej, a określone rozcieńczenia dawek można przygotowywać na bieżąco codziennie.

39. Częstotliwość dawkowania będzie uzależniona od wykorzystanego modelu (aby uzyskać informacje na temat modelu niedojrzałych osobników, zob. pkt 29 i pkt 30, aby uzyskać informacje na temat modelu osobników poddanych owariektomii). Niedojrzałym samicom szczurów podaje się badaną substancję chemiczną codziennie przez trzy kolejne dni. Trzydniowy okres podawania zaleca się także w przypadku samic szczurów poddanych owariektomii, ale dopuszcza się dłuższe okresy narażenia, co może ułatwić wykrywanie substancji chemicznych charakteryzujących się słabą aktywnością. W przypadku samic myszy poddanych owariektomii 3-dniowy okres podawania powinien być wystarczający i przedłużenie tego okresu do siedmiu dni nie przyniesie żadnej istotnej korzyści w przypadku silnych agonistów estrogenów, jednakże nie wykazano takiego związku w odniesieniu do słabych estrogenów w badaniu walidacyjnym (16), zatem dawkowanie należy wydłużyć do 7 kolejnych dni w przypadku dorosłych myszy poddanych owariektomii.Dawkę należy podawać każdego dnia o takiej samej porze. W razie potrzeby dawki należy skorygować, aby utrzymać stały poziom dawki w stosunku do masy ciała zwierzęcia (np. jeden mg badanej substancji chemicznej na kilogram masy ciała na dobę). Biorąc pod uwagę objętość stosowaną w badaniu w stosunku do masy ciała, należy ograniczyć do minimum jej zmienność, dostosowując stężenie roztworu dozującego w celu zapewnienia stałej objętości w stosunku do masy ciała w odniesieniu do wszystkich dawek i do każdej drogi podawania.

▼M5

40. W przypadkach, w których badaną substancję chemiczną podaje się przez sondę, należy to robić, podając zwierzętom pojedynczą dawkę dobową przy użyciu sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Maksymalna objętość płynu, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Należy przestrzegać lokalnych wytycznych dotyczących opieki nad zwierzętami, jednak przedmiotowa objętość nie powinna przekroczyć 5 ml/kg masy ciała, z wyjątkiem roztworów wodnych, w przypadku których można stosować objętość wynoszącą 10 ml/kg masy ciała.

41. Jeżeli badana substancja chemiczna podawana jest drogą wstrzyknięcia podskórnego, należy to robić, stosując pojedynczą dawkę dobową. Dawki należy podawać w okolice łopatki na grzbiecie lub w okolice lędźwi przy użyciu sterylnej igły (np. o rozmiarze 23 lub 25 G) lub strzykawki tuberkulinowej. Golenie miejsca wstrzyknięcia nie jest obowiązkowe. Należy odnotować wszelkie straty, wycieki w miejscu wstrzyknięcia lub przypadki niepełnego podania dawki. Łączna objętość wstrzykiwana jednemu szczurowi w ciągu doby nie powinna przekraczać 5 ml/kg masy ciała, rozdzielona na 2 miejsca wstrzyknięcia, z wyjątkiem roztworów wodnych, w przypadku których można stosować objętość wynoszącą 10 ml/kg masy ciała.

Obserwacje

Obserwacje ogólne i kliniczne

42. Ogólne obserwacje kliniczne należy przeprowadzać przynajmniej raz dziennie, a w przypadku zaobserwowania oznak toksyczności ze zwiększoną częstotliwością. Najlepiej jest prowadzić obserwacje o tych samych godzinach doby z uwzględnieniem okresu oczekiwanych skutków szczytowych po dawkowaniu. Należy prowadzić obserwacje zwierząt pod kątem śmiertelności, zachorowalności i ogólnych objawów klinicznych, takich jak zmiany w zachowaniu, skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, występowanie wydzielin i wydalin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego (np. łzawienie, piloreksja, rozmiar źrenic, nietypowy rytm oddychania).

Masa ciała i spożycie pokarmu

43. Wszystkie zwierzęta należy codziennie ważyć z dokładnością do 0,1 g, zaczynając tuż przed rozpoczęciem dawkowania, tj. w momencie przydzielania zwierząt do grup. Nieobowiązkowo można mierzyć ilości spożywanego pokarmu przypadające na każdą klatkę w trakcie okresu dawkowania, ważąc w tym celu karmniki. Wyniki dotyczące spożycia pokarmu należy wyrażać w gramach na szczura na dobę.

Sekcja i pomiar masy macicy

44. Szczury zostaną uśmiercone w sposób humanitarny po upływie 24 godzin od ostatniej dawki. Najlepiej jest dokonywać sekcji na losowo wybranych zwierzętach z grup w celu uniknięcia progresji rosnącej lub malejącej w ramach grup dawkowania, co mogłoby nieznacznie wpłynąć na dane. Celem testu biologicznego jest dokonanie pomiaru masy zarówno mokrej, jak i osuszonej macicy. Mokra masa obejmuje macicę i zawartość płynu w świetle macicy. Pomiaru suchej masy dokonuje się po wydobyciu i usunięciu płynu w świetle macicy.

45. W przypadku niedojrzałych zwierząt przed przeprowadzeniem sekcji bada się pochwę pod kątem jej otwarcia. Sekcję rozpoczyna się od otwarcia ściany brzucha, zaczynając od spojenia łonowego. Następie z grzbietowej ściany brzucha usuwa się róg macicy i jajniki, jeżeli są obecne. Pęcherz moczowy i moczowody usuwane są z brzusznej i bocznej części macicy i pochwy. Następnie odłącza się zrost włóknisty między odbytnicą a pochwą do momentu, w którym można zidentyfikować miejsce złączenia ujścia pochwy i skóry krocza. Macicę i pochwę odłącza się od ciała poprzez wykonanie nacięcia ściany pochwy tuż nad miejscem złączenia ujścia pochwy i skóry krocza, jak przedstawiono na rys 2. Macicę należy odłączyć od ściany ciała,

▼M5

delikatnie przecinając krezki macicy w punkcie jej złączenia wzdłuż całej długości grzbietowo-bocznej części każdego rogu macicy. Po usunięciu macicy z ciała należy wystarczająco szybko ją zbadać, aby uniknąć osuszenia tkanek. Utrata wagi wynikająca z osuszenia jest istotniejsza w przypadku małych tkanek, takich jak tkanki macicy (23). Jeżeli jajniki są obecne, usuwa się je przy jajowodzie, unikając wypłynięcia płynu ze światła rogu macicy. W przypadku gdy zwierzęta poddano owariektomii, należy zbadać pozostałości pod kątem obecności tkanki jajnikowej. Nadmiar tłuszczu i tkanki łącznej należy usunąć. Pochwę usuwa się z macicy tuż pod szyjką, tak aby pozostawić szyjkę wraz z trzonem macicy, jak przedstawiono na rys. 2.

46. Każdą macicę należy umieścić w indywidualnie oznakowanym i zważonym pojemniku (np. w szalce Petriego lub szalce wagowej z tworzywa sztucznego), kontynuując działania zapobiegające osuszeniu przed ważeniem (np. w pojemniku można umieścić bibułę filtracyjną delikatnie zwilżoną solą fizjologiczną). Macicę z płynem w świetle macicy waży się z dokładnością do 0,1 mg (mokra masa macicy).

47. Następnie każdą macicę przetwarza się oddzielnie w celu usunięcia płynu. Oba rogi macicy nakłuwa się lub nacina podłużnie. Macicę umieszcza się na lekko zwilżonej bibule filtracyjnej (np. Whatman nr 3) i przyciska się drugim kawałkiem lekko zwilżonej bibuły filtracyjnej celem całkowitego usunięcia płynu. Macicę bez zawartości płynu w świetle waży się z dokładnością do 0,1 mg (sucha masa macicy).

48. Można wykorzystać masę macicy, jaką ustalono na koniec badania, aby zapewnić, że nie został przekroczony odpowiedni wiek niedojrzałych niebadanych szczurów, jednakże w tej kwestii decydujące znaczenie mają dane historyczne dotyczące szczepu szczurów wykorzystanego przez laboratorium (aby uzyskać szczegóły na temat interpretacji wyników, zob. pkt 56).

Badania nieobowiązkowe

49. Po zważeniu macicę można utrwalić w 10-procentowej obojętnej, zbuforowanej formalinie w celu przeprowadzenia badania histopatologicznego po zabarwieniu hematoksyliną i eozyną. Należy w podobny sposób zbadać pochwę (zob. pkt 9). Dodatkowo do celów porównania ilościowego można dokonać pomiaru morfometrycznego nabłonka błony śluzowej macicy.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

50. Dane uzyskane w ramach badania powinny obejmować:

— liczbę zwierząt na początku badania,

— liczbę i tożsamość zwierząt, które poniosły śmierć podczas badania lub które uśmiercono z przyczyn humanitarnych, oraz datę i czas każdej śmierci lub każdego humanitarnego uśmiercenia,

— liczbę i tożsamość zwierząt wykazujących oznaki toksyczności oraz opis zaobserwowanych oznak toksyczności wraz z czasem ich wystąpienia, czasem trwania i stopniem dotkliwości każdego efektu toksycznego, oraz

— liczbę i tożsamość zwierząt wykazujących jakiekolwiek zmiany patologiczne oraz opis rodzaju tych zmian.

▼M5

51. Należy rejestrować dane dotyczące masy ciała, mokrej masy macicy i suchej masy macicy poszczególnych zwierząt. Należy przeprowadzić jednostronne analizy statystyczne agonistów, aby określić, czy wynikiem podawania badanej substancji chemicznej był istotny statystycznie ($p < 0,05$) wzrost masy macicy. Należy wykonać odpowiednie analizy statystyczne, aby zbadać zmiany związane z dawkowaniem w przypadku suchej i mokrej masy macicy. Przykładowo oceny danych można dokonać, stosując analizę kowariancji (ANCOVA) z wykorzystaniem masy ciała w momencie przeprowadzania sekcji jako zmiennej towarzyszącej. Przed dokonaniem analizy danych można przeprowadzić logarytmiczną transformację stabilizującą wariancję z wykorzystaniem danych dotyczących macic. Test Dunnetta i Hsu jest odpowiedni do przeprowadzania porównań w parach z każdej grupy dawkowania z grupami kontrolnymi nośnika oraz do obliczania przedziałów ufności. W celu wykrycia ewentualnych wartości odstających i dokonania oceny jednorodności wariancji można zastosować wykres pozostałości regresji. Powyższe procedury zastosowano w programie walidacyjnym OECD, wykorzystując wersję 8 programu PROC GLM w środowisku SAS (*Statistical Analysis System*) (SAS Institute, Cary, Karolina Północna) (6)(7).

52. Sprawozdanie końcowe musi zawierać następujące informacje:

Placówka badawcza:

— szczegóły dotyczące odpowiedzialnych pracowników i ich obowiązków w zakresie badań,

— dane z początkowego badania kontroli dodatniej i okresowe dane dotyczące dodatniej grupy kontrolnej (zob. pkt 26 i 27).

Badana substancja chemiczna:

— cechy charakterystyczne badanej substancji chemicznej,

— właściwości fizyczne i w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne,

— metody i częstotliwości przygotowywania rozcieńczeń,

— wszelkie dane dotyczące stabilności,

— wszelkie analizy roztworów dozujących.

Nośnik:

— charakterystyka badanego nośnika (charakter, dostawca i partia),

— uzasadnienie wyboru nośnika (jeśli jest inny niż woda).

Badane zwierzęta:

— gatunek i szczep oraz uzasadnienie ich wyboru,

— dostawca i określony obiekt dostawcy,

— wiek zwierząt w momencie dostarczenia i dzień narodzin,

— w przypadku niedojrzałych zwierząt informacje, czy zostały dostarczone z matką lub matką zastępczą, i data odsadzenia,

— szczegóły dotyczące procedur aklimatyzacji zwierząt,

— liczba zwierząt w każdej klatce,

— szczegóły i metody dotyczące identyfikacji pojedynczych zwierząt i grup zwierząt.

Warunki testu:

— szczegóły dotyczące procesu randomizacji (tj. stosowanej metody),

— uzasadnienie wyboru dawki,

▼M5

— szczegóły dotyczące postaci badanej substancji chemicznej, osiąganych przez nią stężeń, stabilności i jednorodności,

— szczegóły dotyczące podawania badanej substancji chemicznej i uzasadnienie wyboru drogi narażenia,

— szczegóły dotyczące paszy (nazwa, rodzaj, dostawca, zawartość i, jeżeli są znane, poziomy fitoestrgenów),

— źródło wody (np. woda wodociągowa lub woda filtrowana) i sposób jej doprowadzenia (przewodami z dużego pojemnika, w butelkach itp.),

— ściółka (nazwa, rodzaj, dostawca, skład),

— rejestr warunków w klatce, okresów oświetlania, temperatury w pomieszczeniu i wilgotności, czyszczenia pomieszczenia,

— szczegółowy opis sekcji i procedur ważenia macic,

— opis procedur statystycznych.

Wyniki:

Poszczególne zwierzęta:

— wszystkie masy ciała poszczególnych zwierząt uzyskane w ramach codziennego ważenia (od momentu przydzielenia zwierząt do grup do sekcji) (z dokładnością do 0,1 g),

— wiek każdego zwierzęcia (w dniach, licząc dzień narodzin jako dzień 0) w momencie rozpoczęcia podawania badanej substancji chemicznej,

— data i czas podania każdej dawki,

— obliczona podana objętość i dawka oraz obserwacje dotyczące wszelkich strat związanych z dawkowaniem w trakcie podawania lub po podaniu,

— codzienny rejestr stanu zwierzęcia, w tym istotne objawy i obserwacje,

— podejrzewana przyczyna śmierci (w przypadku gdy w trakcie badania zwierzę padnie lub będzie w stanie agonalnym),

— data i czas humanitarnego uśmiercenia wraz z odstępem czasowym od ostatniego podania dawki,

— mokra masa macicy (z dokładnością do 0,1 mg) i wszelkie przypadki zaobserwowania utraty płynu w świetle macicy w trakcie sekcji i przygotowań do ważenia,

— sucha masa macicy (z dokładnością do 0,1 mg).

Każda grupa zwierząt:

— średnie masy ciała poszczególnych zwierząt uzyskane w ramach codziennego ważenia (z dokładnością do 0,1 g) i odchylenia standardowe (od momentu przydzielenia zwierząt do grup do sekcji),

— średnie masy wilgotnych macic i średnie masy osuszonych macic (z dokładnością do 0,1 mg) oraz odchylenia standardowe,

— dzienne spożycie pokarmu, jeżeli było mierzone (obliczane w gramach spożytego pokarmu na zwierzę),

▼M5

— wyniki statystycznych analiz porównujących zarówno masy wilgotnych, jak i osuszonych macic badanych grup w stosunku do tych samych pomiarów przeprowadzonych w grupach kontrolnych nośnika,

— wyniki statystycznych analiz porównujących całkowitą masę ciała i przyrost masy ciała badanych grup w stosunku do tych samych pomiarów przeprowadzonych w grupach kontrolnych nośnika.

53. Podsumowanie istotnych orientacyjnych faktów dotyczących metody badawczej

	Szczury	**Myszy**
Zwierzęta		
Szczep	Powszechnie wykorzystywany szczep gryzoni doświadczalnych	
Liczba zwierząt	Co najmniej 6 zwierząt w każdej grupie dawkowania	
Liczba grup	Co najmniej 2 grupy badane (aby uzyskać wskazówki zob. pkt 33) i ujemna grupa kontrolna Aby uzyskać wskazówki dotyczące dodatnich grup kontrolnych zob. pkt 26 i 27	
Warunki trzymania i żywienia		
Temperatura w pomieszczeniu dla zwierząt (w °C)	22 °C ± 3 °C	
Wilgotność względna	50–60 %, ale nie mniej niż 30 % ani więcej 70 %	
Dobowy cykl oświetlenia	12 godzin światła, 12 godzin ciemności	
Pasza i woda pitna	Ad libitum	
Utrzymywanie zwierząt	Pojedynczo lub w grupach o liczebności nieprzekraczającej trzech zwierząt (zaleca się trzymanie niedojrzałych zwierząt w grupach społecznych)	
Pasza i ściółka	Zaleca się wykorzystywanie pasz i ściółki zawierających niskie poziomy fitoestrogenów	
Protokół		
Metoda	Niedojrzałe zwierzęta nie poddane owariektomii (metoda preferowana). Metoda badań dorosłych samic poddanych owariektomii	Dorosłe samice poddane owariektomii
Wiek niedojrzałych zwierząt w momencie rozpoczęcia dawkowania	Najwcześniej w dniu 18 po urodzeniu. Należy zakończyć dawkowanie przed dniem 25 po urodzeniu	Nie dotyczy zakresu bieżącej metody badawczej
Wiek zwierzęcia w momencie poddania go owariektomii	6–8 tygodni życia	
Wiek zwierząt poddanych owariektomii w momencie rozpoczęcia dawkowania	Między przeprowadzeniem owariektomii a pierwszym dniem podawania powinno upłynąć co najmniej 14 dni	Między przeprowadzeniem owariektomii a pierwszym dniem podawania powinno upłynąć co najmniej 7 dni
Masa ciała	Zmienność masy ciała powinna być możliwie jak najmniejsza i nie powinna przekraczać ± 20 % średniej masy ciała	

▼M5

	Szczury	Myszy
Dawkowanie		
Droga podawania	Przez sondę drogą doustną lub przez podskórne wstrzyknięcie	
Częstotliwość podawania	Jedna dawka dziennie	
Objętość dawki podawanej przez sondę lub przez wstrzyknięcie	≤ 5 ml/kg masy ciała (lub maksymalnie 10 ml/kg masy ciała w przypadku roztworów wodnych) (podawane w 2 miejsca wstrzyknięcia w przypadku podskórnej drogi podawania)	
Czas trwania dawkowania	3 kolejne dni w przypadku modelu badania niedojrzałych zwierząt. Co najmniej 3 kolejne dni w przypadku modelu badania zwierząt poddanych owariektomii	7 kolejnych dni w przypadku modelu badania zwierząt poddanych owariektomii
Czas sekcji	Po upływie około 24 godzin od podania ostatniej dawki	
Wyniki		
Reakcja dodatnia	Istotny statystycznie wzrost średniej masy macicy (mokrej lub suchej)	
Estrogen referencyjny	Etynyloestradiol 17-α	

WYTYCZNE DOTYCZĄCE INTERPRETACJI I ZATWIERDZENIA WYNIKÓW

54. Wynik badania estrogenności należy na ogół uznać za dodatni, jeżeli ma miejsce istotny statystycznie wzrost masy macicy ($p < 0,05$) przy wysokiej dawce w stosunku do grupy kontrolnej, w której zastosowano rozpuszczalnik. Wynik dodatni jest dodatkowo potwierdzany przez wykazanie wiarygodnego biologicznie związku między dawką a skalą reakcji, mając na uwadze fakt, że nakładające się na siebie działania estrogenne i antyestrogenne badanej substancji chemicznej mogą mieć wpływ na kształt krzywej dawka-odpowiedź.

55. Należy zachować szczególną ostrożność, aby nie przekroczyć maksymalnej tolerowanej dawki w celu umożliwienia wiarygodnej interpretacji danych. W związku z tym należy dokonywać starannej oceny spadku masy ciała, objawów klinicznych i pozostałych ustaleń.

56. Masy macic uzyskane w grupie kontrolnej nośnika są istotnymi czynnikami mającymi wpływ na zatwierdzenie danych wynikających z biologicznego testu wzrostu macicy. Wysokie wartości uzyskane w grupie kontrolnej mogą zaburzyć zdolność reakcji w teście biologicznym oraz zdolność wykrywania bardzo słabych agonistów estrogenu. Przeglądy literatury i dane otrzymane w trakcie walidacji biologicznego testu wzrostu macicy wskazują na spontaniczne przypadki występowania wysokich średnich w grupach kontrolnych, w szczególności w przypadku niedojrzałych zwierząt (2)(3)(6)(9). Ponieważ masa macicy u niedojrzałych szczurów zależy od wielu zmiennych, takich jak szczep lub masa ciała, nie można określić ostatecznej górnej granicy masy macicy. Dla orientacji, jeżeli suche masy macic u niedojrzałych szczurów w grupie kontrolnej wynoszą 40–45 mg, wyniki należy uznać za podejrzane, a uzyskanie mas macic przekraczających 45 mg może prowadzić do konieczności powtórzenia badania. Powyższe należy jednak rozpatrywać w odniesieniu do każdego przypadku indywidualnie (3)(6)(8). W przypadku przeprowadzania badań na dorosłych szczurach niepełna owariektomia może skutkować obecnością pozostałości tkanki jajnikowej, która może produkować endogenny estrogen i opóźniać regresję masy macicy.

▼M5

57. Suche masy macic grupy kontrolnej nośnika, wynoszące mniej niż 0,09 % masy ciała w przypadku niedojrzałych samic szczurów i mniej niż 0,04 % w przypadku młodych dorosłych samic poddanych owariektomii, wydają się dawać dopuszczalne wyniki [zob. tabela 31 (2)]. Jeżeli masy macic w grupie kontrolnej przekroczą powyższe poziomy, należy skontrolować szereg różnych czynników, takich jak wiek zwierząt, poprawność wykonania owariektomii, poziom fitoestrogenów w paszy itd. oraz należy zachować ostrożność, wykorzystując ujemny wynik (brak oznak aktywności estrogennej) testu.

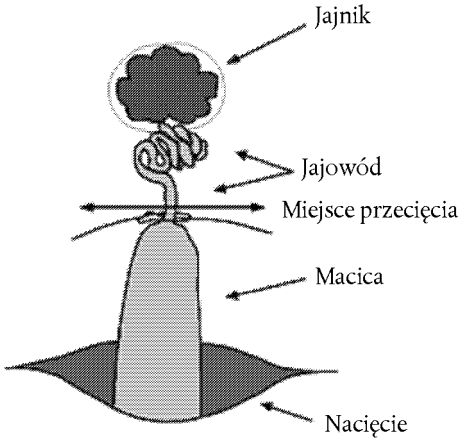
58. Należy zachować dane historyczne dotyczące grup kontrolnych nośnika w laboratorium. W laboratorium należy również zachować dane historyczne dotyczące reakcji na dodatnie estrogeny referencyjne, takie jak etynyloestradiol 17-a. W laboratoriach można także badać reakcje na znanych słabych agonistów estrogenów. Wszystkie powyższe dane mogą być porównywane z dostępnymi danymi (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8), aby zapewnić odpowiednią czułość metod stosowanych w laboratorium.

59. W trakcie badania walidacyjnego OECD w przypadku suchych mas macic wykazano mniejszą zmienność niż w przypadku mokrej masy macic (6)(7). Istotna reakcja w przypadku któregokolwiek z powyższych pomiarów wskazywałaby na dodatni wynik aktywności estrogennej badanej substancji chemicznej.

60. Reakcja wzrostu macicy nie jest wyłącznie pochodzenia estrogennego, jednak dodatni wynik biologicznego testu wzrostu macicy należy ogólnie interpretować jako dowód wskazujący na potencjał estrogenowy *in vivo* i test powinien zazwyczaj prowadzić do podjęcia działań mających na celu uzyskanie dalszych wyjaśnień (zob. pkt 9 i „ramy koncepcyjne OECD w zakresie badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego” zawarte w dodatku 2).

Rysunek 1

Schemat przedstawiający chirurgiczne usuwanie jajników



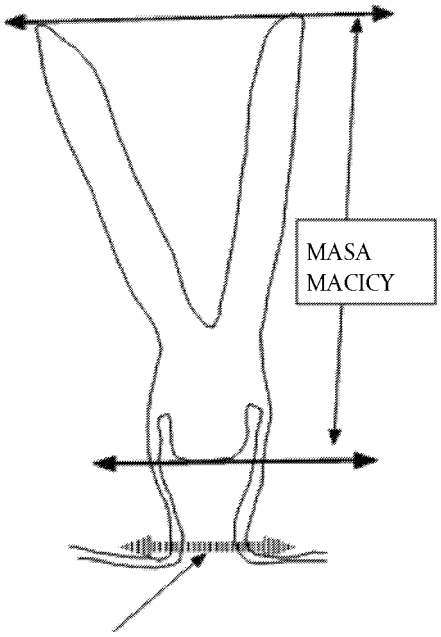
Na rys. nie pokazano krezki macicy, układu naczyniowego i ciała tłuszczowego

Zabieg rozpoczyna się od otwarcia grzbietowo-bocznej ściany brzucha w środkowym punkcie między dolną granicą żeber a grzebieniem biodrowym oraz wykonania nacięcia o długości kilku milimetrów w poprzek do bocznej granicy mięśnia lędźwiowego. Należy zlokalizować jajniki w jamie brzusznej zwierzęcia. Następnie w aseptycznych warunkach fizycznie usuwa się jajniki z jamy brzusznej, podwiązując miejsce między jajnikiem a macicą, aby zatamować krwawienie, i dokonuje się odłączenia jajnika przez nacięcie nad miejscem podwiązania w miejscu złączenia jajowodu i każdego rogu macicy. Po potwierdzeniu, że krwawienie nie nasila się, należy zamknąć ścianę brzucha przez założenie szwu oraz zamknąć skórę np. za pomocą klipsa lub szwu. Zwierzęta powinny odzyskać przytomność oraz powinien nastąpić regres masy macicy przynajmniej 14 dni przed ich wykorzystaniem.

▼**M5**

Rysunek 2

Usunięcie i przygotowanie tkanek macicy w celu pomiaru masy



Zabieg rozpoczyna się od otwarcia ściany brzucha od spojenia łonowego. Następie z tylnej ściany brzucha usuwa się każdy jajnik, jeżeli są obecne, oraz róg macicy. Pęcherz moczowy i moczowody usuwa się z brzusznej i bocznej części macicy i pochwy. Następnie oddziela się zrost włóknisty między odbytnicą a pochwą do momentu, w którym można zidentyfikować miejsce złączenia ujścia pochwy i skóry krocza. Macicę i pochwę odłącza się od ciała przez wykonanie nacięcia ściany pochwy tuż nad miejscem złączenia ze skórą krocza, jak przedstawiono na powyższym rysunku. Macicę należy odłączyć od ściany ciała przez delikatne przecięcie krezki macicy w punkcie jej łączenia wzdłuż całej długości grzbietowo-bocznej części każdego rogu macicy. Po usunięciu macicy z ciała należy usunąć nadmiar tłuszczu i tkanki łącznej. Jeżeli jajniki są obecne, usuwa się je przy jajowodzie, unikając wypłynięcia płynu ze światła rogu macicy. W przypadku gdy zwierzęta poddano owariektomii, należy zbadać pozostałości pod kątem obecności tkanki jajnikowej. Pochwę usuwa się z macicy tuż pod szyjką, tak aby pozostawić szyjkę wraz z trzonem macicy, jak przedstawiono na powyższym rysunku. Następnie można zważyć macicę.

▼**M5**

Dodatek 1

DEFINICJE:

Antyestrogenność oznacza zdolność substancji chemicznej do hamowania estradiolu 17-beta w organizmach ssaków.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Dzień narodzin oznacza dzień 0 po urodzeniu.

Dawkowanie jest terminem ogólnym obejmującym dawkę, częstotliwość i czas trwania dawkowania.

Dawka jest ilością podawanej badanej substancji chemicznej. W odniesieniu do biologicznego testu wzrostu macicy dawka wyrażana jest w jednostkach wagowych badanej substancji chemicznej na jednostkę masy ciała badanego zwierzęcia doświadczalnego na dzień (np. mg/kg masy ciała/dobę).

Maksymalna tolerowana dawka (MTD) jest najwyższą ilością substancji chemicznej, która po wprowadzeniu do organizmu nie powoduje śmierci badanych zwierząt doświadczalnych (oznaczana jako LD_0) (IUPAC, 1993 r.).

Estrogenność oznacza zdolność substancji chemicznej do działania jak estradiol 17-beta w organizmach ssaków.

Dzień X po urodzeniu oznacza X-ty dzień życia po dniu narodzin.

Czułość oznacza odsetek wszystkich dodatnich/aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki kategoryczne i stanowi parametr istotny do celów oceny przydatności metody badawczej.

Swoistość oznacza odsetek wszystkich ujemnych/aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki kategoryczne i stanowi parametr istotny do celów oceny przydatności metody badawczej.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę, badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

Wzrost macicy jest pojęciem używanym do określania dodatniego wpływu na rozwój tkanek macicy.

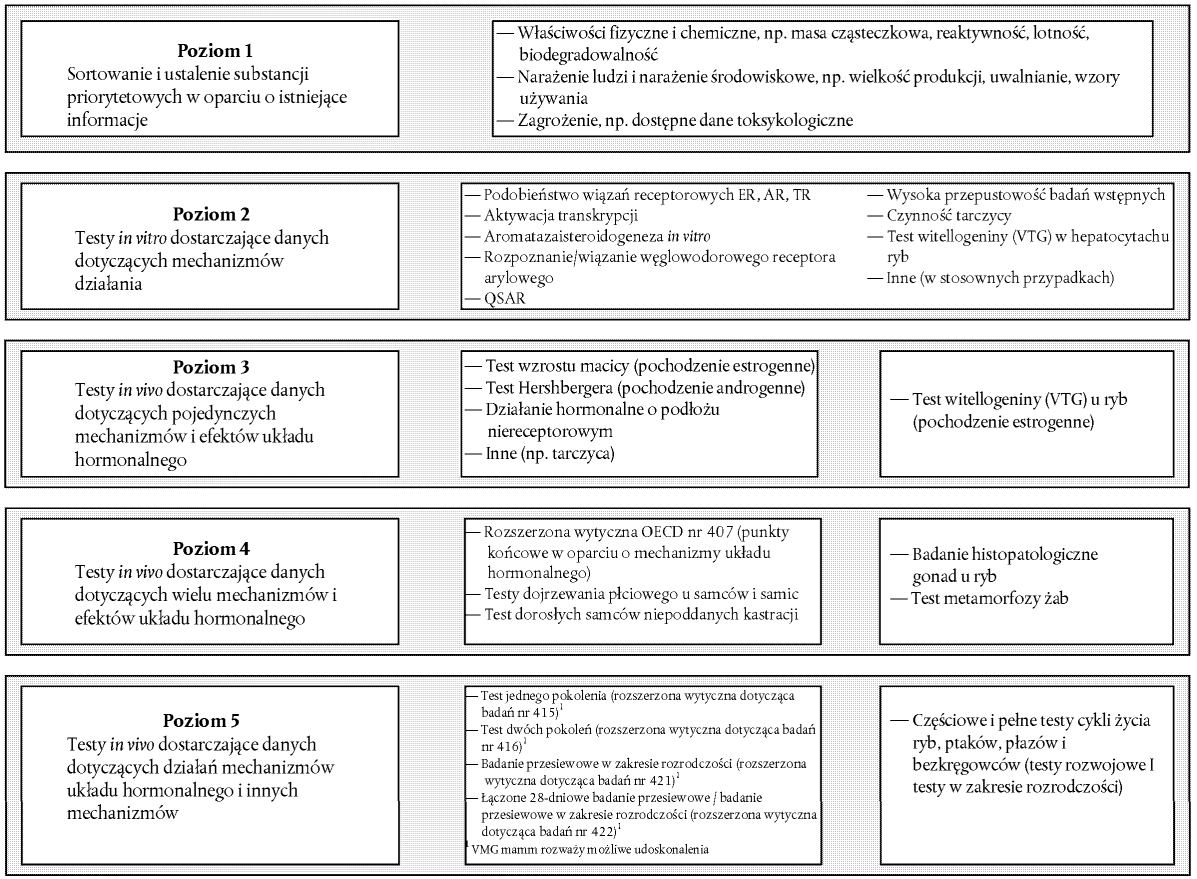
Walidacja oznacza proces naukowy opracowany do określania wymogów operacyjnych i ograniczeń metody badawczej oraz do wykazywania jej wiarygodności i przydatności dla konkretnego celu.

▼M5

Dodatek 2

Uwaga: Dokument sporządzony przez członków sekretariatu programu wytycznych dotyczących badań w oparciu o porozumienie osiągnięte na szóstym posiedzeniu grupy zadaniowej ds. badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego

Ramy koncepcyjne OECD w zakresie badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego



VMG mamm: zespół zarządzania walidacją ds. badań i oceny ssaków

02008R0440 — PL — 16.10.2019 — 008.001 — 911

▼**M5**

UWAGI DO POWYŻSZYCH RAM:

Uwaga 1: Istnieje możliwość rozpoczynania i rezygnacji na wszystkich poziomach i zależy to od charakteru istniejącego zapotrzebowania na informacje do celów oceny zagrożenia i ryzyka.

Uwaga 2: Na poziomie 5 w badaniach z zakresu ekotoksykologii należy zawrzeć punkty końcowe, wskazujące mechanizmy niepożądanych skutków i potencjalne szkody dla populacji.

Uwaga 3: W przypadku gdy model multimodalny obejmuje kilka testów pojedynczych punktów końcowych, przedmiotowy model zastąpi stosowanie tych testów pojedynczych punktów końcowych.

Uwaga 4: Ocena każdej substancji chemicznej powinna opierać się na indywidualnych przypadkach, z uwzględnieniem wszystkich dostępnych informacji, mając na uwadze rolę poziomów powyższych ram koncepcyjnych.

Uwaga 5: Obecnienie należy traktować powyższych ram koncepcyjnych jako wytycznych obejmujących wszystkie kwestie. Poziomy 3, 4 i 5 obejmują testy, które są dostępne lub w odniesieniu do których trwa proces walidacji. W odniesieniu do tej ostatniej kwestii testy te zostały tymczasowo włączone. Po ich opracowaniu i przeprowadzeniu walidacji zostaną oficjalnie dodane do ram koncepcyjnych.

Uwaga 6: Nie należy uznawać, że poziom 5 zawiera wyłącznie badania ostateczne. Uznaje się, że badania uwzględnione na tym poziomie przyczyniają się do ogólnej oceny zagrożenia i ryzyka.

▼M5

LITERATURA

(1) OECD (1998), 'Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force', 10–11 marca 1998 r., 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* nr 38, ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens, J.W., Ashby, J., (2002), 'Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent', *Crit. Rev. Toxicol. 32*, s. 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* nr 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 estrogenic responses: Phase 1' *Environ Health Perspect 109*, s. 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* nr 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: Phase Two — Dose Response Studies', *Environ. Health Persp. 111*, s. 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*, s. 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*, s. 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*, s. 582–587.

(11) Branham, W.S., Sheehan, D.M, Zehr, D.R., Ridlon, E., Nelson, C.J., (1985), 'The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17b-estradiol', *Endocrinology 117*, s. 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*, s. 10–15.

(13) Zarrow, M.X., Lazo-Wasem, E.A., Shoger, R.L., (1953), 'Estrogenic activity in a commercial animal ration' *Science 118*,s. 650–651.

(14) Drane, H.M., Patterson, D.S.P., Roberts, B.A., Saba, N., (1975), 'The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake', *Fd. Cosmet. Toxicol. 13*, s. 425–427.

(15) Boettger-Tong, H., Murphy, L., Chiappetta, C., Kirkland, J.L., Goodwin, B., Adlercreutz, H., Stancel, G.M., 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*, s. 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* nr 67.

(17) Degen, G.H., Janning, P., Diel, P., Bolt, H.M., (2002), ‘Estrogenic isoflavones in rodent diets’, *Toxicol. Lett. 128*, s. 145–157.

(18) Wade, M.G., Lee, A., McMahon, A., Cooke, G., Curran, I., (2003), ‘The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats’, *Food Chem. Toxicol. 41*, s. 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*, s. 613–620.

(20) Thigpen, J.E., Haseman, J.K., Saunders, H.E., Setchell, K.D.R., Grant, M.F., Forsythe, D., (2003), ‘Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice’, *Comp. Med. 53*, s. 477–485.

(21) Ashby, J., Tinwell, H., Odum, J., Kimber, I., Brooks, A.N., Pate, I., Boyle, C.C., (2000), ‘Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development’, *J. Appl. Toxicol. 20*, s. 343–347.

(22) Thigpen, J.E., Lockear, J., Hasemanm, J., Saunders, H.E., Caviness, G., Grant, M.F., Forsythe, D.B., (2002), ‘Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays’, *Cancer Detect. Prev. 26*, s. 381–393.

(23) Thigpen, J.E., Li, L.-A., Richter, C.B., Lebetkin, E.H., Jameson, C.W., (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*, s. 596–601.

(24) OECD (2008), ‘Acute oral toxicity — up-and-down procedure’, *OECD Guideline for the testing of chemicals* nr 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’, *Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment* nr 19, ENV/JM/MONO(2000)7.

(26) OECD (2001), ‘Guidance document on acute oral toxicity’, *Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment* nr 24, ENV/JM/MONO(2001)4.

(27) Bulbring, E. i Burn, J.H., (1935), ‘The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution’, *J. Physiol. 85*, s. 320–333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. i Koch, F.C., (1936), ‘The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis’, *Endocrinology 19*, s. 33– 41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. i Neal, B.H., (1996), ‘Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization’, *Fundam. Appl. Toxicol. 34*, s. 288–305.

(30) Jones, R.C. i Edgren, R.A., (1973), ‘The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat’, *Fertil. Steril. 24*, 284–291.

(31) OECD (1982), Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju — ‘Principles of Good Laboratory Practice’, ISBN 92-64-12367-9, Paryż.

(32) Dorfman, R.I., (1962), ‘Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization’, Nowy Jork, *Academic Press*.

(33) Thigpen, J.E., *et al*. (2004), ‘Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studiem’, *ILAR J 45(4)*, s. 401–416.

▼**M5**

(34) Gray, L.E. i Ostby, J., (1998), ‘Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanizm’, *Toxicol Ind Health. 14 (1–2)*, s. 159–184.

(35) Booth, A.N., Bickoff, E.M. i Kohler, G.O., (1960), ‘Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products’, *Science 131*, s. 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 assai’, *J. Agric Food Chem. 52*, s. 1410–1414.

(37) OECD (2007), ‘Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment’, nr 71.

(38) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33).

▼M5

B.55. **TEST BIOLOGICZNY HERSHBERGERA NA SZCZURACH: KRÓTKOTERMINOWE BADANIE PRZESIEWOWE WŁAŚCIWOŚCI (ANTY)ANDROGENNYCH**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest zgodna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 441 (2009 r.). W 1998 r. OECD podjęła działania o wysokim priorytecie, mające na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych na potrzeby badań przesiewowych i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (1). Jednym z elementów tych działań było opracowanie wytycznych dotyczących testu biologicznego Hershbergera na szczurach. Po kilkudziesięciu latach stosowania tego testu przez przemysł farmaceutyczny został on po raz pierwszy znormalizowany w 1962 r. przez oficjalny komitet ekspertów jako narzędzie przesiewowe w odniesieniu do androgennych substancji chemicznych (2). W latach 2001–2007 test biologiczny Hershbergera na szczurach został objęty intensywnym programem walidacyjnym, w ramach którego sporządzono dokument przeglądowy kontekstu (23), dokument zawierający zestawienie szczegółowych metod (3), opracowano wytyczne dotyczące sekcji (21) oraz prowadzono intensywne wewnątrzlaboratoryjne i międzylaboratoryjne badania mające na celu pokazanie wiarygodności i odtwarzalności testu biologicznego. Wspomniane badania walidacyjne prowadzono na silnym androgenie referencyjnym (propionat testosteronu), dwóch silnych androgenach syntetycznych (octanie trenbolonu i metylotestosteronie), silnym antyandrogennym produkcie leczniczym (flutamidzie), silnym inhibitorze syntezy (finasterydzie) naturalnego androgenu (dihydrotestosteronu), kilku słabo antyandrogennych pestycydach (linuronie, winklozolinie, procymidonie, p,p' DDE), inhibitorze 5-alfa-reduktazy (finasterydzie) i dwóch znanych negatywnych substancjach chemicznych (dinitrofenolu i nonylofenolu) (4)(5)(6)(7)(8). Przedmiotowa metoda badawcza jest wynikiem wieloletniego doświadczenia związanego ze stosowaniem testu biologicznego i doświadczenia zdobytego w trakcie programu badań walidacyjnych i jego wyników.

2. Test biologiczny Hershbergera jest krótkoterminowym badaniem przesiewowym *in vivo*, w którym wykorzystuje się dodatkowe tkanki układu rozrodczego u samca. Test został opracowany w latach 30. i zmodyfikowany w latach 40. ubiegłego stulecia w taki sposób, aby uwzględniał mięśnie reagujące na androgeny w układzie rozrodczym samca (2)(9–15). W latach 60. ubiegłego stulecia oceniono ponad 700 potencjalnych androgenów, wykorzystując w tym celu unormowaną wersję protokołu (2)(14), a stosowanie testu zarówno w przypadku androgenów, jak i antyandrogenów uważano za metodę standardową także w latach 60. (2)(15). Obecnie stosowany test biologiczny oparty jest na zmianach masy pięciu zależnych od androgenów tkanek u wykastrowanego samca szczura w okresie wczesnego dojrzewania. W ramach testu ocenia się zdolność substancji chemicznej do wywołania aktywności biologicznej zgodnej z agonistami lub antagonistami androgenów lub inhibitorami 5-alfa-reduktazy. Do pięciu docelowych tkanek zależnych od androgenów, które są objęte tym testem, należą: dobrzuszny płat gruczołu krokowego, pęcherzyk nasienny (plus płyny i gruczoły koagulujące), mięsień dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty, parzyste gruczoły Cowpera i żołądź. W przypadku wykastrowanego samca szczura w okresie wczesnego dojrzewania te wszystkie pięć tkanek reaguje na androgeny przyrostem masy całkowitej. Jeżeli te same tkanki stymuluje się w celu zwiększenia masy przez podawanie silnego androgenu referencyjnego, wszystkie pięć tkanek reaguje na antyandrogeny utratą masy całkowitej. Pierwotnym modelem testu biologicznego Hershbergera był chirurgicznie wykastrowany samiec w okresie wczesnego dojrzewania, co zostało poddane walidacji w fazach 1, 2 i 3 programu walidacyjnego Hershbergera.

3. Test biologiczny Hershbergera pełni rolę mechanistycznego badania przesiewowego *in vivo* w zakresie agonistów androgenów, antagonistów androgenów oraz inhibitorów 5-alfa-reduktazy i należy postrzegać test w kontekście „Ram koncepcyjnych OECD w zakresie badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego” (dodatek 2). W tym dokumencie test biologiczny Hershbergera został umieszczony na poziomie

▼M5

3 jako test *in vivo* zapewniający dane o pojedynczym mechanizmie hormonalnym, tj. (anty)androgenności. Test ma być włączony do zestawu testów *in vitro* i *in vivo* mających na celu identyfikację substancji chemicznych, które mogą wchodzić w interakcję z układem hormonalnym, ostatecznie prowadząc do oceny zagrożenia i ryzyka dla zdrowia ludzkiego lub środowiska.

4. Z uwagi na kwestię dobrostanu zwierząt w związku z procedurą kastracji starano się, aby alternatywnym modelem do celów testu biologicznego Hershbergera został niekastrowany stymulowany samiec w okresie odsadzeniowym, aby uniknąć etapu kastracji. Przeprowadzono walidację metody badawczej stymulacji w okresie odsadzenia (24); jednak w trakcie badań walidacyjnych okazało się, że wersja testu biologicznego Hershbergera stosowanego w okresie odsadzenia nie pozwala w spójny sposób wykryć skutków działania słabych anty-androgenów na masę organów zależnych od androgenów przy badanych dawkach. W związku z tym nie została ona ujęta w tej metodzie badawczej. Uznając jednak, że korzystanie z tej metody może przynieść nie tylko korzyści dla dobrostanu zwierząt, ale umożliwi także uzyskanie informacji dotyczących innych rodzajów działań, jest ona dostępna w wytycznych OECD 115 (25).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

5. Agoniści i antagoniści androgenów działają jako ligandy receptorów androgenów oraz mogą odpowiednio aktywować lub hamować transkrypcję genów kontrolowaną przez receptory. Ponadto niektóre substancje chemiczne hamują przekształcanie testosteronu w silniejszy androgen naturalny dihydrotestosteron w niektórych docelowych tkankach androgenowych (inhibitory 5-alfa-reduktazy). Takie substancje chemiczne mogą powodować niepożądane zagrożenia dla zdrowia, w tym wpływ na reprodukcję i rozwój. W związku z tym istnieje regulacyjna potrzeba szybkiego dokonywania oceny i badania substancji chemicznej jako potencjalnego agonisty lub antagonisty androgenu lub inhibitora 5-alfa-reduktazy. Powinowactwo ligandu w odniesieniu do receptora androgenu zmierzone przez wiązanie z receptorami lub aktywację transkrypcji genów reporterowych *in vitro*, chociaż ma charakter informacyjny, nie stanowi jedynej determinanty potencjalnego zagrożenia. Pozostałe determinanty obejmują aktywację i dezaktywację metaboliczną w momencie dostania się substancji do organizmu, dystrybucję substancji chemicznych do tkanek docelowych i klirens tych substancji z organizmu. Stąd wynika potrzeba skontrolowania ewentualnego działania substancji chemicznej *in vivo* w odpowiednich warunkach i przy odpowiednim narażeniu. Ocena *in vivo* ma nieco mniejsze znaczenie, jeżeli znane są właściwości substancji chemicznej w odniesieniu do absorpcji, dystrybucji, metabolizmu i eliminacji. Tkanki zależne od androgenów reagują na stymulację androgenami szybkim i gwałtownym wzrostem, w szczególności w przypadku wykastrowanych samców szczurów w okresie wczesnego dojrzewania. Gryzonie, w szczególności szczury, wykorzystuje się także powszechnie w badaniach toksyczności do celów charakteryzowania zagrożeń. W związku z tym wersja testu, w której wykorzystuje się wykastrowane szczury w okresie wczesnego dojrzewania i pięć docelowych tkanek w tym teście, jest odpowiednia do celów badań przesiewowych *in vivo* pod kątem agonistów i antagonistów androgenów oraz inhibitorów 5-alfa-reduktazy.

6. Powyższą metodę badawczą opracowano w oparciu o te protokoły wykorzystywane w badaniu walidacyjnym OECD, które okazały się wiarygodne i odtwarzalne w badaniach wewnątrzlaboratoryjnych i międzylaboratoryjnych (4)(5)(6)(7)(8). W metodzie tej przedstawia się zarówno procedury dotyczące androgenów, jak i antyandrogenów.

7. Chociaż różne laboratoria wprowadziły pewną zmianę w dawkach propionatu testosteronu stosowanych w celu wykrycia antyandrogenów w programie walidacyjnym OECD w odniesieniu do testu biologicznym Hershbergera (0,2 w porównaniu do 0,4 mg/kg/dobę, wstrzyknięcie podskórne), różnica pod względem zdolności wykrywania słabego lub silnego działania antyandrogennego między tymi dwoma zmienionymi protokołami była niewielka. Jest jednak oczywiste, że dawka propionatu testosteronu nie powinna być zbyt wysoka, żeby blokowała wpływ słabych antagonistów receptora androgenowego, lub tak niska, żeby tkanki androgenne wykazywały niewielką reakcję wzrostową nawet bez podania antyandrogenów.

▼M5

8. Reakcja wzrostowa poszczególnych tkanek zależnych od androgenów nie jest wyłącznie pochodzenia androgennego, tj. masa określonych tkanek może ulegać zmianom pod wpływem substancji chemicznych innych niż agoniści androgenów. Reakcja wzrostowa różnych tkanek jednocześnie świadczy jednak o mechanizmie bardziej ukierunkowanym na androgeny. Na przykład duże dawki silnych estrogenów mogą powodować zwiększanie masy pęcherzyka nasiennego; pozostałe tkanki zależne od androgenów uwzględnione w teście nie reagują jednak w taki sam sposób. Antyandrogenne substancje chemiczne mogą działać jako antagoniści receptora androgenów lub jako inhibitory 5-alfa-reduktazy. Inhibitory 5-alfa-reduktazy mają zróżnicowane działanie, ponieważ przekształcenie w silniejszy w działaniu dihydrotestosteron różni się w zależności od tkanki. Antyandrogeny, które blokują 5-alfa-reduktazę, takie jak finasteryd, oddziałują w większym stopniu na dobrzuszny płat gruczołu krokowego niż na inne tkanki w porównaniu do silnego antagonisty receptora androgenowego, jakim jest flutamid. Ta różnica w reakcjach tkanek może być wykorzystywana do odróżnienia trybów działania receptora androgenowego i 5-alfa-reduktazy. Receptor androgenowy jest ponadto ewolucyjnie powiązany z receptorem innych hormonów steroidowych i niektórych innych hormonów, jeżeli jest podawany w dużych, suprafizjologicznych dawkach, może wiązać i antagonizować działanie wzrostowe propionatu testosteronu (13). Ponadto jest również prawdopodobne, że zwiększony metabolizm steroidów i konsekwentne obniżanie poziomu testosteronu w surowicy mogłoby ograniczyć wzrost tkanek zależnych od androgenów. W związku z tym każdy wynik dodatni w teście biologicznym Hershbergera należy zazwyczaj oceniać, stosując zasadę wagi dowodu, w tym testy *in vitro*, takie jak testy wiążące receptor androgenowy i receptor estrogenowy oraz odpowiadające im testy aktywacji transkrypcyjnej, lub inne testy *in vivo*, które polegają na badaniu podobnych tkanek docelowych zależnych od androgenów, takie jak test młodego samca w okresie dojrzewania, 15-dniowy test niekastrowanego samca lub 28-dniowe lub 90-dniowe badania toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem.

9. Doświadczenie wskazuje, że androgeny ksenobiotyczne występują rzadziej niż antyandrogeny ksenobiotyczne. Przewiduje się zatem, że test biologiczny Hershbergera będzie wykorzystywany najczęściej do badania przesiewowego antyandrogenów. Procedura przeprowadzania testów na androgeny mogłaby jednak być zalecania w odniesieniu do substancji steroidowych lub sterydopodobnych, lub substancji, w przypadku których wskazanie możliwego działania androgennego zostało oparte na metodach poziomu 1 lub 2 ram koncepcyjnych (dodatek 2). Podobnie niepożądane skutki związane z (anty)androgennymi profilami można obserwować w testach poziomu 5, co prowadzi do konieczności oceny, czy substancja chemiczna działa na zasadzie hormonu.

10. Uznano, że wszelkie procedury, w których wykorzystuje się zwierzęta, powinny być zgodne z lokalnymi normami w zakresie utrzymywania zwierząt; przedstawione poniżej opisy dotyczące utrzymywania i traktowania zwierząt stanowią minimalne standardy wykonywania badań i zostaną zastąpione przez lokalne przepisy, takie jak dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (26). OECD udziela dalszych wskazówek dotyczących humanitarnego traktowania zwierząt (17).

11. Podobnie jak w przypadku każdego testu biologicznego, w ramach którego wykorzystuje się zwierzęta doświadczalne, należy starannie przemyśleć konieczność przeprowadzenia tego badania. Zasadniczo można wyróżnić dwa powody takiej decyzji:

— wysokie prawdopodobieństwo narażenia (poziom 1 ram koncepcyjnych) lub wskazania w odniesieniu do (anty)androgenności w testach *in vitro* (poziom 2) wspierających badania dotyczące tego, czy takie działania mogą wystąpić *in vivo*,

— działania zgodne z (anty)androgennością na poziomie 4 lub 5 badań *in vivo* wspierających badania szczegółowego sposobu działania, np. w celu określenia, czy działania były związane z mechanizmem (anty)androgennym.

▼M5

12. Definicje stosowane w tej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

13. Czułość testu biologicznego Hershbergera zostaje osiągnięta dzięki wykorzystaniu samców z minimalną endogenną produkcją androgenów. Cel ten osiąga się dzięki wykorzystaniu wykastrowanych samców, pod warunkiem że zapewnia się odpowiedni czas po kastracji na powrót tkanek docelowych do minimalnej i jednakowej masy podstawowej. Zatem w przypadku badań przesiewowych prowadzonych pod kątem potencjalnego działania androgennego istnieją niskie endogenne poziomy androgenów w krwioobiegu, oś podwzgórze-przysadka-gonady nie jest w stanie kompensować za pośrednictwem mechanizmów sprzężenia zwrotnego, zdolność tkanek do reakcji ulega maksymalnemu zwiększeniu, a zmienność początkowej masy tkanek maleje do minimum. W przypadku badań przesiewowych pod kątem potencjalnego działania antyandrogennego można uzyskać bardziej spójny przyrost masy tkanek, jeżeli tkanki stymuluje się androgenem referencyjnym. W związku z powyższym test biologiczny Hershbergera wymaga wyłącznie 6 zwierząt na grupę dawkowania, natomiast w przypadku innych badań z niekastrowanymi samcami w okresie dojrzewania lub samcami dorosłymi zaleca się wykorzystywanie 15 samców na grupę dawkowania.

14. Kastrację samców szczurów w okresie wczesnego dojrzewania należy wykonać w sposób właściwy, stosując zatwierdzone znieczulenie i technikę aseptyczną. Należy podać środki przeciwbólowe w pierwszych kilku dniach po zabiegu w celu wyeliminowania dyskomfortu pozabiegowego. Kastracja zwiększa precyzję badania w zakresie wykrywania słabych androgenów i antyandrogenów przez eliminowanie kompensacyjnych hormonalnych mechanizmów sprzężenia zwrotnego obecnych u niekastrowanego zwierzęcia, które mogą osłabiać działanie podawanych androgenów i antyandrogenów, oraz przez eliminowanie dużej międzyosobniczej zmienności w poziomach testosteronu w surowicy. Kastracja ogranicza zatem liczbę zwierząt wymaganych do badań przesiewowych w zakresie działania tych hormonów.

15. W przypadku badań przesiewowych pod kątem potencjalnego działania androgennego badana substancja chemiczna podawana jest codziennie przez sondę drogą doustną lub wstrzyknięcie podskórne przez okres dziesięciu kolejnych dni. Badane substancje chemiczne podaje się przynajmniej dwóm badanym grupom zwierząt doświadczalnych, wykorzystując jedną dawkę na grupę. Zwierzęta poddaje się sekcji po upływie około 24 godzin od podania ostatniej dawki. Istotny statystycznie wzrost masy jednego lub większej liczby organów docelowych w grupie otrzymującej badaną substancję w stosunku do grupy kontrolnej nośnika wskazuje na działanie androgenne badanej substancji chemicznej (zob. pkt 60). Androgeny, jak trenbolon, które nie mogą ulec przemianie pod wpływem 5-alfa-reduktazy, silniej oddziałują na mięsień dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty oraz na żołądź w porównaniu z propionatem testosteronu, jednak zwiększony przyrost powinien pojawić się w przypadku wszystkich tkanek.

16. W przypadku badań przesiewowych pod kątem potencjalnego działania antyandrogennego badaną substancję chemiczną podaje się codziennie przez sondę drogą doustną lub wstrzyknięcie podskórne przez okres dziesięciu kolejnych dni wraz z codziennymi dawkami propionatu testosteronu (0,2 lub 0,4 mg/kg/dobę) wstrzykiwanymi podskórnie. W programie walidacji stwierdzono, że możliwe jest podawanie propionatu testosteronu w dawce 0,2 lub 0,4 mg/kg/dobę, ponieważ obie dawki są skuteczne w wykrywaniu antyandrogenów i w związku z tym należy wybrać tylko jedną dawkę do stosowania w badaniu. Stopniowane dawki badanej substancji chemicznej podaje się przynajmniej trzem badanym grupom zwierząt doświadczalnych, wykorzystując jedną dawkę na grupę. Zwierzęta poddaje się sekcji po upływie około 24 godzin od podania ostatniej dawki. Istotny statystycznie spadek masy jednego lub większej liczby organów docelowych w grupach, którym podawano badaną substancję chemiczną i propionat testosteronu, w porównaniu z grupą kontrolną, której podawano wyłącznie propionat testosteronu, wskazuje na ewentualne dodatnie antyandrogenne działanie badanej substancji (zob. pkt 61).

▼M5

OPIS METODY BADAWCZEJ

Wybór gatunków i szczepu

17. Do testu biologicznego Hershbergera systematycznie wykorzystywano szczury od lat 30. ubiegłego stulecia. Chociaż z biologicznego punktu widzenia zarówno u szczura, jak i myszy prawdopodobnie wystąpiłyby podobne reakcje, to jednak, opierając się na 70 latach doświadczenia z modelem szczura, właśnie to zwierzę stanowi gatunek preferowany do celów testu biologicznego Hershbergera. Należy dodać, że skoro dane uzyskane w teście Hershbergera mogą stanowić wstęp do długoterminowych badań międzypokoleniowych, umożliwia to wykorzystanie zwierząt pochodzących z tego samego gatunku, szczepu i źródła w obu badaniach.

18. W niniejszym protokole zezwala się laboratoriom na wybór do badania szczepu szczurów, który powinien zasadniczo być jednym z historycznie używanych przez uczestniczące laboratorium. Do badań wykorzystuje się powszechnie stosowane laboratoryjne szczepy szczurów; nie należy jednak wykorzystywać szczepów, które dojrzewają znacznie później niż w 42. dniu życia, ponieważ kastracja takich samców w 42. dniu życia mogłaby uniemożliwić pomiar masy żołędzia, co można wykonać jedynie po oddzieleniu napletka od trzonu prącia. Nie należy zatem stosować szczurów otrzymanych ze szczepu Fisher 344 z wyjątkiem pojedynczych przypadków. Szczury szczepu Fisher 344 odznaczają się innym czasem trwania etapów rozwoju płciowego w porównaniu z innymi stosowanymi częściej szczepami, jak szczepy Sprague Dawley lub Wistar (16). Jeżeli wykorzystuje się jednak taki szczep, laboratorium powinno zapewnić kastrację na nieco późniejszym etapie rozwoju i powinno być w stanie przedstawić czułość zastosowanego szczepu. Laboratorium powinno wyraźnie wskazać powody podjęcia decyzji o wyborze danego szczepu szczurów. W przypadku gdy badanie przesiewowe przeprowadza się jako badanie wstępne poprzedzające badanie toksyczności doustnej wywołanej powtarzanym dawkowaniem, badanie reprodukcyjne i rozwojowe lub badanie długoterminowe, należy wykorzystywać zwierzęta z tego samego szczepu i źródła we wszystkich badaniach.

Warunki trzymania i żywienia

19. Wszystkie procedury powinny być zgodne ze wszystkimi lokalnymi normami opieki nad zwierzętami laboratoryjnymi. Opisy dotyczące opieki nad zwierzętami i ich traktowania stanowią normy minimalne i zostaną zastąpione przez bardziej rygorystyczne lokalne przepisy, takie jak dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (26). Temperatura w pomieszczeniu ze zwierzętami doświadczalnymi powinna wynosić 22 °C (w przybliżeniu z tolerancją ± 3 °C). Wilgotność względna poza okresem czyszczenia pomieszczenia powinna wynosić co najmniej 30 % i nie przekraczać 70 %. Wilgotność względną należy docelowo utrzymywać w granicach 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu dziennym 12 godzin światła, 12 godzin ciemności.

20. Zaleca się trzymanie zwierząt w grupach, a nie w odosobnieniu, ze względu na młody wiek zwierząt i fakt, że szczury są zwierzętami społecznymi. Trzymanie w klatce dwóch lub trzech zwierząt zapobiega ich stłoczeniu i wystąpieniu związanego z tym stresu, co mogłoby utrudniać kontrolę hormonalną rozwoju dodatkowej tkanki płciowej. Klatki należy dokładnie czyścić, aby pozbyć się ewentualnych zanieczyszczeń, i ustawiać je w taki sposób, aby zminimalizować możliwy wpływ położenia klatki. Klatki we właściwym rozmiarze (~2 000 centymetrów kwadratowych) będą zapobiegać zatłoczeniu.

21. Każde zwierzę należy indywidualnie oznakować w celach identyfikacyjnych (np. znak na uszach lub marker), stosując w tym celu humanitarną metodę. Metodę identyfikacji należy odnotować.

▼M5

22. Należy zapewnić paszę laboratoryjną i wodę pitną *ad libitum*. Laboratoria wykonujące test biologiczny Hershbergera powinny używać paszy laboratoryjnej stosowanej zazwyczaj w ich pracy badawczej nad substancjami chemicznymi. W ramach badania walidacyjnego testu biologicznego nie zaobserwowano żadnych skutków ani zmienności, które można powiązać z paszą. Stosowana pasza laboratoryjna zostanie odnotowana i jej próbkę należy zachować na potrzeby przyszłej analizy.

Kryteria wykonywania badań w przypadku masy narządów zależnych od androgenów

23. Podczas badania walidacyjnego nie znaleziono dowodów, że spadek masy ciała wpływa na wzrosty lub spadki wielkości masy tkanek w odniesieniu do tkanek docelowych (tj. tych, które należy uwzględnić w niniejszym badaniu).

24. Wśród różnych szczepów szczurów stosowanych z powodzeniem w programie walidacyjnym masy narządów zależnych od androgenów są większe u cięższych szczepów szczurów niż u szczepów lżejszych. W związku z tym kryteria wykonywania testu biologicznego Hershbergera nie obejmują bezwzględnych przewidywanych mas organów w przypadku kontroli dodatnich i ujemnych.

25. Ponieważ współczynnik zmienności w odniesieniu do tkanki cechuje stosunek odwrotnie proporcjonalny do mocy testu statystycznego, kryteria wykonywania testu biologicznego Hershbergera oparte są na maksymalnych wartościach współczynnika zmienności w przypadku każdej tkanki (tabela 1). Współczynniki zmienności wynikają z badań walidacyjnych OECD. W przypadku ujemnych wyników laboratoria powinny zbadać współczynniki zmienności w grupie kontrolnej i grupie otrzymującej wysoką dawkę w celu stwierdzenia, czy przekroczono maksymalny współczynnik zmienności w odniesieniu do kryteriów wykonywania.

26. Należy powtórzyć badanie w następujących przypadkach: 1) gdy trzy lub większa liczba spośród dziesięciu możliwych indywidualnych współczynników zmienności w grupie kontrolnej i grupie otrzymującej wysoką dawkę przekraczają maksymalne wartości przewidziane dla badań pod kątem agonistów i antagonistów w tabeli 1 oraz 2) co najmniej dwie tkanki docelowe są marginalnie nieistotne, tj. wartości r wynoszą 0,05–0,10.

Tabela 1

Maksymalne dopuszczalne współczynniki zmienności określone dla docelowych dodatkowych gruczołów płciowych w przypadku modelu kastrowanego w badaniu walidacyjnym OECD ([1])

Tkanka	Działanie antyandrogenne	Działanie androgenne
Pęcherzyki nasienne	40 %	40 %
Dobrzuszny płat gruczołu krokowego	40 %	45 %
Mięsień dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty	20 %	30 %
Gruczoły Cowpera	35 %	55 %
Żołądź	17 %	22 %

([1]) Progowy współczynnik zmienności w odniesieniu do danej tkanki określono na podstawie wykresu wartości współczynnika zmienności, uporządkowanych sekwencyjnie od najniższych do najwyższych, jednolicie w odniesieniu do wszystkich eksperymentów w badaniu walidacyjnym przy użyciu konkretnego modelu (agonistycznego lub antagonistycznego). Graniczny współczynnik zmienności odczytano z punktu, w którym przyrosty między następnymi najwyższymi współczynnikami zmienności w serii są znacznie większe niż kilka poprzedzających współczynników zmienności — wartość graniczna. Należy zauważyć, że chociaż w ramach tej analizy zidentyfikowano względnie wiarygodne wartości graniczne w odniesieniu do modelu antagonistycznego testu, krzywe współczynnika zmienności dotyczące testu agonistycznego wykazały bardziej jednolity wzrost, przez co wyznaczenie progowego współczynnika zmienności tą metodą było poniekąd arbitralne.

▼M5

PROCEDURA

Przestrzeganie przepisów i weryfikacja laboratorium

27. W przeciwieństwie do biologicznego testu wzrostu macicy (rozdział B.54 niniejszego załącznika) przedstawienie kompetencji laboratorium przed rozpoczęciem badań nie jest konieczne do przeprowadzenia testu Hershbergera, ponieważ jednoczesne kontrole dodatnie (propionat testosteronu i flutamid) i kontrole ujemne są prowadzone jako integralna część badania.

Liczba i stan zwierząt

28. Każda grupa badana i grupa kontrolna powinna składać się z co najmniej 6 zwierząt. Ma to zastosowanie zarówno do protokołów związanych z działaniem androgennym, jak i antyandrogennym.

Kastracja

29. Po odebraniu zwierząt należy przewidzieć kilkudniowy wstępny okres aklimatyzacji, aby zapewnić zwierzętom dobry stan zdrowia i rozwój. Ponieważ w przypadku zwierząt wykastrowanych przed 42. dniem życia (42. dniem po urodzeniu) może nie pojawiać się oddzielenie napletka, zwierzęta należy kastrować w 42. dniu po urodzeniu lub później, ale nie wcześniej. Zwierzęta kastruje się w znieczuleniu przez nacięcie w moszni i usunięcie obu jąder i najądrza, a następnie podwiązanie naczyń krwionośnych i przewodów nasiennych. Po potwierdzeniu, że nie występuje krwawienie, należy zamknąć moszną za pomocą szwu lub klipsu chirurgicznego. Zwierzętom należy podawać środki przeciwbólowe przez pierwszych kilka dni po zabiegu w celu złagodzenia jakiegokolwiek dyskomfortu pozabiegowego. Jeżeli kastrowane zwierzęta nabywa się od dostawcy zwierząt, informacje na temat wieku zwierząt i etapu dojrzałości płciowej powinny zostać dostarczone przez dostawcę.

Aklimatyzacja po kastracji

30. Zwierzęta powinny nadal aklimatyzować się w warunkach laboratoryjnych w celu umożliwienia regresu masy tkanek docelowych przez co najmniej 7 dni po kastracji. Zwierzęta należy obserwować codziennie, a każde zwierzę z oznakami choroby lub fizycznych anomalii należy wyłączać z badań. Poddawanie działaniu substancji poprzez rozpoczęcie dawkowania (w trakcie badań) można zatem rozpocząć się dopiero w 49. dniu po urodzeniu, ale nie później niż w 60. dniu po urodzeniu. Wiek w momencie przeprowadzania sekcji nie powinien przekraczać 70. dnia od urodzenia. Ta elastyczność umożliwia pracownikom laboratorium zaplanowanie prac eksperymentalnych w sposób efektywny.

Masa ciała i randomizacja grupy

31. Różnice w indywidualnej masie ciała są źródłem zmienności w masie tkanek zarówno w obrębie grup zwierząt, jak i między tymi grupami. Zwiększająca się zmienność masy tkanek skutkuje zwiększonym współczynnikiem zmienności i zmniejszoną statystyczną mocą testu (określaną czasami jako czułość testu). W związku z tym zróżnicowanie masy ciała należy kontrolować zarówno eksperymentalnie, jak i statystycznie.

32. Kontrola eksperymentalna obejmuje tworzenie niewielkich zróżnicowań masy ciała w obrębie badanych grup i między tymi grupami. Po pierwsze, należy unikać wykorzystywania niezwykle małych lub dużych zwierząt i nie włączać ich do badania kohortowego. W momencie rozpoczęcia badań zróżnicowanie masy wykorzystywanych zwierząt nie powinno przekraczać ± 20 % średniej masy (np. 175 g ± 35 g w przypadku wykastrowanych szczurów w okresie wczesnego dojrzewania). Po drugie, zwierzęta należy przydzielić do grup (zarówno kontrolnych, jak i badanych) zgodnie z randomizowanym rozkładem masy w taki sposób, aby średnia masa ciała danej grupy nie odbiegała statystycznie od pozostałych grup. Należy odnotować procedurę randomizacji blokowej.

▼M5

33. Ponieważ toksyczność może powodować zmniejszenie masy ciała w obrębie grup badanych w stosunku do grupy kontrolnej, masa ciała w pierwszym dniu podawania badanej substancji chemicznej mogłaby zostać wykorzystana jako statystyczna zmienna towarzysząca, a nie masa ciała ustalona przy sekcji.

Dawkowanie

34. W celu stwierdzenia, czy badana substancja chemiczna może mieć działanie androgenne *in vivo*, zazwyczaj wystarczają dwie grupy dawkowania badanej substancji chemicznej plus kontrola dodatnia i kontrola nośnika (ujemna) (zob. pkt 43), dlatego też taki projekt badania jest preferowany ze względu dobrostan zwierząt. Jeżeli celem jest uzyskanie krzywej dawka-odpowiedź lub ekstrapolowanie do mniejszych dawek, potrzebne są co najmniej 3 grupy dawkowania. Jeżeli wymagane są informacje wykraczające poza kwestię działania androgennego (takie jak oszacowanie siły działania), należy rozważyć zastosowanie innego schematu dawkowania. W celu przeprowadzenia badania w zakresie antyandrogenów badaną substancję chemiczną podaje się razem z agonistą androgenu referencyjnego. Należy wykorzystać co najmniej 3 grupy badane objęte różnymi dawkami badanej substancji chemicznej oraz kontrolę dodatnią i ujemną (zob. pkt 44). Z wyjątkiem podawania badanej substancji chemicznej zwierzęta w grupie kontrolnej należy traktować w identyczny sposób jak zwierzęta w grupie badanej. Jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej używa się nośnika, grupa kontrolna powinna otrzymać największą objętość nośnika zastosowaną w przypadku grupy badanej.

35. Wszystkie dawki należy proponować i dobierać z uwzględnieniem wszelkich istniejących danych dotyczących toksyczności i danych (toksyko)kinetycznych dostępnych w odniesieniu do substancji badanej lub materiałów pokrewnych. Stosując najwyższą dawkę, należy, po pierwsze, uwzględnić LD_{50} lub informacje dotyczące ostrej toksyczności w celu uniknięcia śmierci, poważnego cierpienia lub stresu u zwierząt (17)(18)(19)(20), a w drugiej kolejności uwzględnić dostępne informacje dotyczące dawek stosowanych w badaniach toksyczności podprzewlekłej i przewlekłej. Zasadniczo najwyższa dawka nie powinna powodować spadku ostatecznej masy ciała zwierząt większego niż 10 % masy grupy kontrolnej. Najwyższa dawka powinna być 1) najwyższą dawką, która zapewnia zwierzętom przeżycie i która nie wiąże się ze znaczną toksycznością lub stresem u zwierząt po 10 kolejnych dniach podawania dawki wynoszącej maksymalne 1000 mg/kg/dobę (zob. pkt 36) lub 2) dawką wywołującą działania (anty)androgenne, w zależności od tego, która z nich jest niższa. W ramach badań przesiewowych dopuszcza się duże odstępy pomiędzy kolejnym dawkowaniem, np. pół jednostki logarytmicznej (odpowiadających sekwencji dawkowania równej 3,2) lub nawet jedną jednostkę logarytmiczną. W przypadku braku dostępności odpowiednich danych można przeprowadzić badanie ustalające zakres dawkowania (zob. pkt 37), aby wspomóc określenie dawek, które należy stosować.

Poziom dawki granicznej

36. Jeżeli badanie przy dawce równej 1 000 mg/kg masy ciała/dobę i dawce niższej z wykorzystaniem procedur opisanych w przypadku tego badania nie jest w stanie wywołać istotnej statystycznie zmiany masy narządów rozrodczych, wówczas zastosowanie dodatkowych dawek można uznać za zbędne. Dawka graniczna ma zastosowanie z wyjątkiem przypadków, w których dane dotyczące narażenia ludzi wskazują na potrzebę zastosowania wyższej dawki.

Uwagi dotyczące ustalania zakresu dawkowania

37. W razie potrzeby można przeprowadzić wstępne badanie ustalające zakres dawkowania, wykorzystując kilka zwierząt w celu doboru odpowiednich grup dawkowania [stosując metody badania ostrej toksyczności (rozdział B.1 bis, B.1 ter niniejszego załącznika (27), OECD TG 425 (19))]. Celem testu biologicznego Hershbergera jest dobór dawek, które zapewniają zwierzętom przeżycie i które nie wiążą się ze znaczną toksycznością lub stresem u zwierząt po dziesięciu kolejnych dniach podawania substancji

▼M5

chemicznej w wysokości równej dawce granicznej wynoszącej 1 000 mg/kg/dobę, jak wskazano w pkt 35 i 36. W związku z tym można skorzystać z dokumentu zawierającego wytyczne OECD (17), w którym przedstawiono objawy kliniczne wskazujące na toksyczność lub stres u zwierząt. Jeżeli jest to wykonalne w ramach przedmiotowego badania ustalającego zakres dawkowania, po dziesięciu dniach podawania substancji tkanki docelowe można wyciąć i zważyć po upływie około 24 godzin od podania ostatniej dawki. Dane te można następnie wykorzystać w celu ułatwienia doboru dawek w badaniu głównym.

Substancje chemiczne odniesienia i nośnik

38. Agonistą androgenu odniesienia powinien być propionat testosteronu, nr CAS 57-82-5. Dawkowanie propionatu testosteronu odniesienia może wynosić 0,2 mg/kg masy ciała/dobę lub 0,4 mg/kg masy ciała/dobę. Antagonistą androgenu referencyjnego powinien być flutamid, nr CAS 1311-84-7. Dawka referencyjna flutamidu powinna wynosić 3 mg/kg masy ciała/dobę i powinna być podawana razem z dawką referencyjną propionatu testosteronu.

39. Zaleca się, na ile to możliwe, rozważenie użycia w pierwszej kolejności roztworu wodnego/zawiesiny wodnej. Ponieważ jednak wiele ligandów androgenów lub ich prekursorów metabolicznych wykazuje zazwyczaj właściwości hydrofobowe, najpowszechniejszym podejściem jest użycie roztworu/zawiesiny w oleju (np. kukurydzianym, z orzechów arachidowych, oleju sezamowym lub w oliwie z oliwek). Badane substancje chemiczne można rozpuścić w minimalnej ilości etanolu 95 % lub w innych odpowiednich rozpuszczalnikach i rozcieńczyć w badanym nośniku do uzyskania końcowych stężeń roboczych. Należy znać właściwości toksyczne rozpuszczalnika i zbadać je w oddzielnej grupie kontrolnej rozpuszczalnika. Jeżeli badana substancja chemiczna zostanie uznana za stabilną, można zastosować delikatne podgrzewanie i energiczne mieszanie w celu łatwiejszego rozpuszczenia badanej substancji chemicznej. Należy oznaczyć stabilność badanej substancji chemicznej w nośniku. Jeżeli badana substancja chemiczna jest stabilna w trakcie badań, wówczas można przygotować jedną początkową podwielokrotność badanej substancji i przygotowywać codziennie określone rozcieńczenia dawek, zachowując ostrożność dla uniknięcia zanieczyszczenia i zepsucia się próbek.

Podawanie dawek

40. Propionat testosteronu należy podawać przez wstrzyknięcie podskórne, a flutamid przez sondę drogą doustną.

41. Substancję chemiczną podaje się drogą doustną przez sondę lub przez podskórne wstrzyknięcie. Przy wyborze drogi podawania należy kierować się dobrostanem zwierząt oraz uwzględniać fizykochemiczne właściwości badanej substancji chemicznej. Ponadto przed rozpoczęciem intensywnych, długoterminowych badań należy wziąć pod uwagę aspekty toksykologiczne, takie jak związek z drogą narażenia na działanie substancji u ludzi (np. droga doustna przez sondę jako odpowiednik spożycia substancji, podskórne wstrzyknięcie jako odpowiednik inhalacji lub wchłaniania przez skórę) oraz istniejące informacje toksykologiczne i dane dotyczące metabolizmu i kinetyki (np. konieczność unikania efektu pierwszego przejścia, zwiększona efektywność przez podanie substancji określoną drogą), jeżeli uzyska się dodanie wyniki na skutek wstrzyknięcia.

42. Zwierzętom należy dawkować substancje w taki sam sposób i w równych odstępach czasu przez dziesięć kolejnych dni w przybliżeniu w 24-godzinnych odstępach czasu. Należy codziennie dostosowywać wielkość dawki na podstawie towarzyszących dawkowaniu codziennych pomiarów masy ciała. Objętość dawki i czas podania należy odnotowywać każdego dnia, w którym następuje narażenie na działanie substancji. Należy zachować szczególną ostrożność, aby nie przekroczyć dawki maksymalnej określonej w pkt 35 w celu umożliwienia wiarygodnej interpretacji danych. W związku z tym należy dokonać gruntownej oceny spadku masy ciała, objawów klinicznych i innych ustaleń. Do podawania drogą doustną należy użyć sondy dożołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Maksymalna objętość płynu,

▼M5

jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Należy przestrzegać lokalnych wytycznych dotyczących opieki nad zwierzętami, jednak przedmiotowa objętość nie powinna przekroczyć 5 ml/kg masy ciała, z wyjątkiem roztworów wodnych, w przypadku których można stosować objętość wynoszącą 10 ml/kg masy ciała. W przypadku wstrzyknięć podskórnych dawki należy podawać w okolice łopatki na grzbiecie lub w okolice lędźwi przy użyciu sterylnej igły (np. o rozmiarze 23 lub 25 G) lub strzykawki tuberkulinowej. Golenie miejsca wstrzyknięcia nie jest obowiązkowe. Należy odnotować wszelkie straty, wycieki w miejscu wstrzyknięcia lub przypadki niepełnego podania dawki. Całkowita objętość wstrzykiwanej dawki przypadająca na jednego szczura na dobę nie powinna przekraczać 0,5 ml/kg masy ciała.

Procedury szczegółowe w odniesieniu do agonistów androgenu

43. W przypadku badania w zakresie agonistów androgenów grupa nośnika stanowi kontrolę ujemną, a grupa objęta podawaniem propionatu testosteronu stanowi kontrolę dodatnią. Aktywność biologiczną zgodną z agonistami androgenów bada się przez podawanie badanym grupom badanej substancji chemicznej w określonych dawkach przez 10 kolejnych dni. Masy pięciu płciowych gruczołów dodatkowych z grup badanej substancji chemicznej porównuje się z grupą nośnika w zakresie istotnych statystycznie przyrostów wagi.

Procedury szczegółowe w odniesieniu do antagonistów androgenu i inhibitorów 5-alfa-reduktazy

44. W przypadku badania w zakresie antagonistów androgenu i inhibitorów 5-alfa-reduktazy grupa objęta podawaniem propionatu testosteronu stanowi kontrolę ujemną, a grupa, której podaje się jednocześnie dawki referencyjne propionatu testosteronu i flutamidu, stanowi kontrolę dodatnią. Aktywność biologiczną zgodną z antagonistami androgenu i inhibitorami 5-alfa-reduktazy bada się, podając dawkę referencyjną propionatu testosteronu i badanej substancji chemicznej przez 10 kolejnych dni. Masy pięciu płciowych gruczołów dodatkowych z grupy objętej podawaniem propionatu testosteronu i grupy badanej substancji chemicznej porównuje się pod względem istotnych statystycznie spadków masy z grupą odniesienia, która otrzymywała wyłącznie propionat testosteronu.

OBSERWACJE

Obserwacje kliniczne

45. Ogólne obserwacje kliniczne należy przeprowadzać przynajmniej raz dziennie, a przypadku zaobserwowania oznak toksyczności ze zwiększoną częstotliwością. Najlepiej jest prowadzić obserwacje o tych samych godzinach doby z uwzględnieniem okresu oczekiwanych skutków szczytowych po dawkowaniu. Należy przeprowadzać obserwacje zwierząt pod kątem śmiertelności, zachorowalności i ogólnych objawów klinicznych, takich jak zmiany w zachowaniu, skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, występowanie wydzielin i wydalin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego (np. łzawienie, piloreksja, rozmiar źrenic, nietypowy rytm oddychania).

46. Każde zwierzę, które poniosło śmierć, należy usunąć i zutylizować bez dalszej analizy danych. Każdą śmierć zwierzęcia poprzedzającą sekcję należy uwzględnić w dokumentacji dotyczącej badania wraz z podaniem wszelkich widocznych przyczyn śmierci. Każde zwierzę w stanie agonalnym należy uśmiercić w sposób humanitarny. Każde zwierzę w stanie agonalnym i w konsekwencji poddane eutanazji należy uwzględnić w dokumentacji dotyczącej badania wraz z podaniem widocznych przyczyn śmierci.

▼M5

Masa ciała i spożycie pokarmu

47. Wszystkie zwierzęta należy codziennie ważyć z dokładnością do 0,1 g, zaczynając tuż przed rozpoczęciem dawkowania, tj. w momencie przydzielania zwierząt do grup. Opcjonalnie można mierzyć ilości spożywanego pokarmu przypadające na każdą klatkę w trakcie okresu dawkowania, ważąc w tym celu karmniki. Wyniki dotyczące spożycia pokarmu należy wyrażać w gramach na szczura na dobę.

Sekcja oraz pomiar masy tkanek i narządów

48. Po około 24 godzinach od ostatniego podania badanej substancji chemicznej szczury należy poddać eutanazji i wykrwawić zgodnie ze standardowymi procedurami stosowanymi w laboratorium prowadzącym, a następnie przeprowadzić sekcję. W sprawozdaniu sporządzonym przez laboratorium należy odnotować metodę zastosowaną do humanitarnego uśmiercenia.

49. Najlepiej jest dokonywać sekcji na losowo wybranych zwierzętach z grup w celu uniknięcia progresji rosnącej lub malejącej w ramach grup dawkowania, co mogłoby wpłynąć na dane. Wszelkie ustalenia dokonane w trakcie sekcji, tj. zmiany patologiczne/widoczne uszkodzenia należy odnotować i zarejestrować.

50. Należy zważyć pięć tkanek zależnych od androgenów (dobrzuszny płat gruczołu krokowego, pęcherzyk nasienny, mięsień-dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty, gruczoły Cowpera, żołądź). Tkanki te należy wyciąć, ostrożnie usunąć nadmiar przylegającej tkanki i tłuszczu i określić natychmiast ich masę w stanie świeżym (nieutrwalonym). Z każdą tkanką należy obchodzić się z zachowaniem szczególnej ostrożności, aby uniknąć utraty płynów i osuszenia, co może być źródłem znacznych błędów i zmienności w wyniku spadku odnotowanych mas. Szereg tkanek może być bardzo małych lub ich wycięcie może sprawiać trudności, co stanie się przyczyną zmienności. W związku z tym ważne jest, aby osoby przeprowadzające sekcję płciowych gruczołów dodatkowych zapoznały się ze standardowymi procedurami przeprowadzania sekcji tych tkanek. Podręcznik dotyczący standardowej procedury operacyjnej dostępny jest na stronach internetowych OECD (21). Dokładne przeszkolenie zgodnie z wytycznymi standardowej procedury operacyjnej zminimalizuje potencjalne źródło powstania zmienności w badaniu. Najlepiej byłoby, gdyby za sekcję danej tkanki odpowiadał ten sam prosektor w celu wyeliminowania różnic międzyosobniczych w trakcie przetwarzania tkanek. Jeżeli nie jest to możliwe, należy przygotować proces sekcji w taki sposób, aby każdy prosektor przeprowadzał sekcję danej tkanki we wszystkich grupach badanych zamiast jednej osoby prowadzącej sekcję wszystkich tkanek z grupy kontrolnej, a innej osoby odpowiedzialnej za grupy badane. Należy zważyć każdą pomocniczą tkankę płciową bez osuszania jej z dokładnością do 0,1 mg i odnotować te pomiary w odniesieniu do każdego zwierzęcia.

51. Szereg tkanek może być bardzo małych lub ich sekcja może sprawiać trudności, co stanie się przyczyną zmienności. Wcześniejsze badania wskazały zakres współczynników zmienności, który wydaje się różnić w zależności od biegłości laboratorium. W kilku przypadkach w obrębie konkretnego laboratorium zaobserwowano znaczne różnice w masie bezwzględnej tkanek takich jak dobrzuszny płat gruczołu krokowego i gruczoły Cowpera.

52. Pomiar masy wątroby, obu nerek i obu nadnerczy jest nieobowiązkowy. Należy jeszcze raz zaznaczyć, że tkanki należy pozbawić przylegającej powięzi i tłuszczu. Wątrobę należy zważyć i pomiar odnotować z dokładnością do 0,1 g; obie nerki i nadnercza zważyć i pomiar odnotować z dokładnością do 0,1 mg. Wątroba, nerki i nadnercza nie tylko pozostają pod wpływem androgenów; stanowią również źródło przydatnych wskaźników toksyczności ogólnoustrojowej.

▼M5

53. Pomiar poziomu hormonu luteinizującego w surowicy (LH), hormonu folikulotropowego (FSH) i testosteronu (T) jest nieobowiązkowy. Określenie poziomów T w surowicy jest przydatne, jeżeli badana substancja chemiczna wywołuje metabolizm wątrobowy testosteronu, zmniejszając tym samym jego poziom w surowicy. Bez danych dotyczących T działanie takie może okazać się działaniem wywołanym za pośrednictwem mechanizmu antyandrogennego. Na podstawie poziomów LH można uzyskać informacje o zdolności antyandrogenu nie tylko do pomniejszania masy organów, ale także do oddziaływania na funkcję podwzgórza-przysadki, co w badaniach długoterminowych może wywołać nowotwory jąder. FSH jest ważnym hormonem w procesie spermatogenezy. Pomiar poziomu T4 i T3 w surowicy, na podstawie którego uzyskano by dodatkowe informacje dotyczące zdolności do zakłócania homeostazy hormonu tarczycy, również jest nieobowiązkowy. Jeżeli pomiary poziomów hormonów mają zostać wykonane, szczury należy poddać znieczuleniu przed sekcją i pobrać krew przez punkcję serca, a metodę znieczulania należy wybrać z zachowaniem ostrożności w taki sposób, aby nie oddziaływała na pomiar hormonów. Należy odnotować metodę przygotowania surowicy, źródło do badania radioimmunologicznego lub inny zestaw pomiarowy, procedury analityczne oraz wyniki. Poziomy LH należy odnotować jako ng na ml surowicy, a poziomy T także należy odnotowywać jako ng na ml surowicy.

54. Sekcja tkanek jest opisywana w następujący sposób wraz ze szczegółowymi informacjami dotyczącymi sekcji, do których dołączone są zdjęcia, publikowane jako materiały uzupełniające w ramach programu walidacyjnego (21). Materiał wideo dotyczący sekcji jest również dostępny na stronach internetowych koreańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (22).

— Po ułożeniu zwierzęcia powierzchnią brzuszną zwróconą do góry należy ustalić, czy napletek prącia oddzielił się od żołędzia. Jeżeli tak, należy następnie zsunąć napletek i usunąć żołądź, zważyć (z dokładnością do 0,1 mg) i odnotować pomiar.

— Rozciąć skórę i ścianę brzucha, odsłaniając narządy wewnętrzne. Jeżeli dokonuje się nieobowiązkowego pomiaru masy narządów, należy usunąć i zważyć wątrobę z dokładnością do 0,1 g, usunąć żołądek i jelita, usunąć i zważyć obie nerki i oba nadnercza z dokładnością do 0,1 mg. W wyniku sekcji odsłonięty zostaje pęcherz i rozpoczyna się sekcja docelowych męskich płciowych gruczołów dodatkowych.

— W celu przeprowadzenia sekcji dobrzusznego płata gruczołu krokowego należy oddzielić pęcherz od warstwy mięśnia brzusznego, przecinając tkankę łączną wzdłuż linii środkowej. Przesunąć pęcherz do przodu w kierunku pęcherzyków nasiennych, odsłaniając lewy i prawy dobrzuszny płat gruczołu krokowego (pokrytego warstwą tłuszczu). Ostrożnie wycisnąć tłuszcz z prawego i lewego płata dobrzusznego gruczołu krokowego. Delikatnie odsunąć prawy dobrzuszny płat gruczołu krokowego od cewki moczowej i odciąć go od cewki moczowej. Przytrzymując prawy dobrzuszny płat gruczołu krokowego, delikatnie odsunąć lewy dobrzuszny płat gruczołu krokowego od cewki moczowej i następnie dokonać jego wycięcia; zważyć z dokładnością do 0,1 mg i odnotować pomiar.

— W celu przeprowadzenia sekcji pęcherzyków nasiennych i gruczołów koagulujących przesunąć pęcherz w kierunku ogona, odkrywając nasieniowód oraz prawy i lewy płat pęcherzyków nasiennych i gruczołów koagulujących. Należy zapobiec wyciekowi płynu przez zaciśnięcie kleszczyków chirurgicznych u podstawy pęcherzyków nasiennych i gruczołów koagulujących w miejscu łączenia się nasieniowodu z cewką moczową. Ostrożnie wyciąć pęcherzyki nasienne i gruczoły koagulujące, zacisnąć kleszczyki chirurgiczne i usunąć tłuszcz i przydatki, umieścić w szalce do ważenia, zdjąć kleszczyki, zważyć z dokładnością do 0,1 mg i odnotować pomiar.

▼M5

— W celu przeprowadzenia sekcji mięśnia dźwigacza odbytu i mięśnia opuszkowo-jamistego należy odsłonić mięśnie i podstawę prącia. Mięśnie dźwigacze odbytu otaczają okrężnicę, a przednie mięśnie dźwigacza odbytu i mięśnie opuszkowo-jamiste połączone są z opuszkami prącia. Należy usunąć skórę i przydatki z okolicy okołoodbytowej rozciągającej się od podstawy prącia do przedniej krawędzi odbytu. Mięśnie opuszkowo-jamiste odcina się stopniowo od opuszka prącia i tkanek. Po rozcięciu okrężnicy na dwie części można dokonać sekcji i usunąć mięśnie dźwigacze odbytu i mięśnie opuszkowo-jamiste. Mięśnie dźwigacze odbytu i mięśnie opuszkowo-jamiste należy oczyścić z tłuszczu i przydatków, zważyć z dokładnością do 0,1 mg i odnotować pomiar.

— Po usunięciu mięśni dźwigaczy odbytu i mięśni opuszkowo-jamistych można dojrzeć okrągłe gruczoły Cowpera lub gruczoły opuszkowo-cewkowe u podstawy opuszków prącia, nieco bliżej grzbietu. Należy zachować ostrożność przy wycinaniu, aby uniknąć naruszenia cienkiej torebki i wycieku płynu. Należy zważyć oba gruczoły Cowpera lub gruczoły opuszkowo-cewkowe z dokładnością do 0,1 mg i odnotować pomiar.

— Ponadto jeżeli w trakcie sekcji i wycinania nastąpi utrata płynu z któregokolwiek gruczołu, fakt ten należy odnotować.

55. Jeżeli ocena każdej substancji chemicznej wymaga sekcji większej liczby zwierząt niż liczba, jaką można wykonać w ciągu jednego dnia, rozpoczęcie badań można rozłożyć na dwa kolejne dni, co skutkuje rozłożeniem sekcji i związanych z tym prac na dwa dni. Jeżeli nastąpi takie rozłożenie badań w czasie, należy wykorzystać połowę zwierząt z grupy badanej.

56. Zwłoki zwierząt należy zutylizować w odpowiedni sposób po przeprowadzeniu sekcji.

SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Dane

57. Dane należy zgłaszać indywidualnie (tj. masa ciała, masa dodatkowych gruczołów płciowych, pomiary nieobowiązkowe i inne reakcje oraz spostrzeżenia) i w odniesieniu do każdej grupy zwierząt (średnie i odchylenia standardowe wszystkich dokonanych pomiarów). Dane należy zestawić w formie tabeli. Dane powinny określać liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które poniosły śmierć podczas badania lub które wykazały oznaki toksyczności, opis zaobserwowanych oznak toksyczności, w tym czas ich pojawienia się, czas trwania i dotkliwość.

58. W końcowym sprawozdaniu należy uwzględnić następujące informacje:

Placówka badawcza:

— nazwa obiektu, lokalizacja,

— kierownik badań i pozostali pracownicy oraz ich obowiązki w trakcie badań,

— daty rozpoczęcia i zakończenia badań, tj. kolejno pierwszy dzień podawania badanej substancji chemicznej i ostatni dzień sekcji.

Badana substancja chemiczna:

— źródło, numer partii/serii, nazwa, czystość, pełny adres dostawcy i charakterystyka badanych substancji chemicznych,

— właściwości fizyczne i w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne,

— warunki przechowywania oraz metoda i częstotliwość przygotowywania rozcieńczeń,

— wszelkie dane dotyczące stabilności,

— wszelkie analizy dawkowanych roztworów/zawiesin.

▼M5

Nośnik:

— charakterystyka nośnika (nazwa, dostawca i numer partii),

— uzasadnienie wyboru danego nośnika (jeżeli nośnikiem nie jest woda).

Badane zwierzęta i procedury hodowli zwierząt:

— wykorzystany gatunek/szczep i uzasadnienie jego wyboru,

— źródło lub dostawca zwierząt, w tym pełne dane adresowe,

— liczba i wiek dostarczonych zwierząt,

— warunki trzymania (temperatura, oświetlenie itp.),

— pasza (nazwa, rodzaj, dostawca, numer partii, skład i, o ile są znane, poziomy fitoestrogenów),

— ściółka (nazwa, rodzaj, dostawca, skład),

— warunki umieszczania zwierząt w klatkach i liczba zwierząt przypadająca na jedną klatkę.

Warunki testu:

— wiek w momencie kastracji, czas trwania aklimatyzacji po kastracji,

— indywidualne masy ciała zwierząt na początku badania (z dokładnością do 0,1 g),

— proces randomizacji i zapis dotyczący przydzielenia zwierząt do grupy nośnika, grupy odniesienia, grup badanej substancji chemicznej oraz klatek,

— średnia i odchylenie standardowe mas ciała w odniesieniu do każdej grupy w odniesieniu do każdego dnia ważenia w trakcie badań,

— uzasadnienie wyboru dawki,

— droga podania badanej substancji chemicznej i uzasadnienie wyboru drogi narażenia,

— w przypadku stosowania testu dotyczącego antyandrogenności, informacje dotyczące dawkowania propionatu testosteronu (dawka i objętość),

— dawkowanie badanej substancji chemicznej (dawka i objętość),

— czas dawkowania,

— procedury dotyczące sekcji, w tym sposoby wykrwawienia i środki znieczulenia,

— jeżeli przeprowadza się analizę surowicy, należy przedstawić szczegóły zastosowanych metod. Na przykład jeżeli stosuje się RIA, należy przedstawić procedurę RIA, źródło narzędzi używanych do RIA, daty wygaśnięcia przydatności narzędzi, procedurę pomiaru scyntylacyjnego oraz standaryzację.

Wyniki:

— codzienne obserwacje każdego zwierzęcia w trakcie dawkowania, obejmujące:

— masę ciała (z dokładnością do 0,1 g),

— objawy kliniczne (jeżeli takie występują),

— wszelkie pomiary lub uwagi w odniesieniu do spożycia pokarmu.

— obserwacje w trakcie sekcji w odniesieniu do każdego zwierzęcia, obejmujące:

▼M5

— datę sekcji,

— grupę badaną, do której należy zwierzę,

— numer identyfikacyjny zwierzęcia,

— prosektora,

— porę dnia, kiedy wykonuje się sekcję i wycinanie,

— wiek zwierzęcia,

— końcową masa ciała przy sekcji, z wyszczególnieniem wszelkich istotnych statystycznie wzrostów lub spadków,

— kolejność wykrwawiania zwierzęcia i wycinania w trakcie sekcji,

— masy pięciu docelowych tkanek zależnych od androgenów:

— dobrzuszny płat gruczołu krokowego (z dokładnością do 0,1 mg),

— pęcherzyki nasienne i gruczoły koagulujące, w tym płyny (oba, z dokładnością do 0,1 mg),

— zespół mięśni dźwigaczy odbytu i mięśni opuszkowo-jamistych (z dokładnością do 0,1 mg),

— gruczoły Cowpera (waga obu gruczołów natychmiast po sekcji, z dokładnością do 0,1 mg),

— żołądź (waga natychmiast po sekcji, z dokładnością do 0,1 mg),

— masy tkanek z pomiarów nieobowiązkowych, jeżeli takie zostały wykonane:

— wątroba (z dokładnością do 0,1 g),

— nerka (obie, z dokładnością do 0,1 mg),

— nadnercze (oba, z dokładnością do 0,1 mg),

— ogólne uwagi i spostrzeżenia,

— analiza poziomu hormonów w surowicy, jeżeli taka została wykonana:

  — LH w surowicy (nieobowiązkowe — ng na ml surowicy), oraz

  — poziom T w surowicy (nieobowiązkowe — ng na ml surowicy),

— ogólne uwagi i spostrzeżenia.

Zestawienie danych:

Dane należy zestawić w formie tabeli obejmującej wielkość próby w odniesieniu do każdej grupy, średnią wartości, błąd standardowy średniej lub odchylenie standardowe. W tabelach należy uwzględnić masy ciała zmierzone w trakcie sekcji, zmiany masy ciała od rozpoczęcia dawkowania aż do sekcji, masy docelowych płciowych gruczołów dodatkowych i wszelkie nieobowiązkowe pomiary mas organów.

Omówienie wyników

Analiza wyników

59. Należy dokonać analizy statystycznej mas ciała i organów zmierzonych w trakcie sekcji pod względem właściwości takich jak homogeniczność wariancji z odpowiednimi przekształceniami danych w razie potrzeby. Grupy badane należy porównać z grupami kontrolnymi, korzystając z technik takich jak ANOVA, a następnie porównanie w parach (np. jednostronny test Dunnetta) oraz kryterium różnicy statystycznej, na przykład $p \leq 0,05$. Należy zidentyfikować grupy, które uzyskują istotność statystyczną. Należy jednak unikać „względnych” mas „organów” ze względu na nieważne statystyczne założenia stanowiące podstawę takich manipulacji danymi.

▼M5

60. W przypadku agonistów androgenów kontrolę powinna stanowić grupa nośnika. Właściwości sposobu działania badanej substancji chemicznej mogą doprowadzić do różnych reakcji względnych między tkankami, na przykład trenbolon, który nie może ulec przemianie pod wpływem 5-alfa-reduktazy, ma bardziej widoczny wpływ na mięsień dźwigacz odbytu i mięśnie opuszkowo-jamiste oraz żołądź niż propionat testosteronu. Istotny statystycznie wzrost ($p \leq 0,05$) masy którychkolwiek dwóch lub większej liczby spośród pięciu docelowych tkanek zależnych od androgenów (dobrzuszny płat gruczołu krokowego, mięsień-dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty, żołądź, gruczoły koagulujące oraz pęcherzyki nasienne i gruczoły koagulujące) należy uznać za dodatni wynik działania agonisty androgenu, przy czym pewien zwiększony wzrost powinien cechować wszystkie docelowe tkanki. Połączoną ocenę wszystkich reakcji płciowych gruczołów dodatkowych można by uzyskać, korzystając z odpowiedniej wielowymiarowej analizy danych. Mogłoby to poprawić jakość analizy, szczególnie w przypadkach, w których tylko pojedyncza tkanka odznacza się istotną statystycznie reakcją.

61. W przypadku antagonistów androgenu grupę kontrolną powinna stanowić grupa badana, której podano androgen referencyjny (wyłącznie propionat testosteronu). Charakterystyka działania badanej substancji chemicznej może doprowadzić do różnych reakcji względnych między tkankami, na przykład inhibitory 5-alfa-reduktazy, jak finasteryd, mają bardziej widoczny wpływ na dobrzuszny płat gruczołu krokowego niż na inne tkanki w porównaniu do silnych antagonistów receptora androgenowego, jak flutamid. Istotny statystycznie spadek ($p \leq 0,05$) masy którychkolwiek dwóch lub większej liczby spośród pięciu docelowych tkanek zależnych od androgenów (dobrzuszny płat gruczołu krokowego, mięsień-dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty, żołądź, gruczoły koagulujące oraz pęcherzyki nasienne i gruczoły koagulujące) w stosunku do dawkowania samego propionatu testosteronu należy uznać za dodatni wynik działania antagonisty androgenu, przy czym pewien zwiększony wzrost powinien cechować wszystkie docelowe tkanki. Połączoną ocenę wszystkich reakcji płciowych gruczołów dodatkowych można by uzyskać, korzystając z odpowiedniej wielowymiarowej analizy danych. Mogłoby to poprawić jakość analizy, szczególnie w przypadkach, w których tylko pojedyncza tkanka odznacza się istotną statystycznie reakcją.

62. Dane należy zestawić w formie tabeli, obejmującej średnią, błąd standardowy średniej (odchylenie standardowe również byłoby dopuszczalne) oraz wielkość próby w odniesieniu do każdej grupy. Należy również dołączyć poszczególne tabele z danymi. Należy przeanalizować wartości indywidualne, średnią, błąd standardowy (odchylenie standardowe) i wartości współczynnika zmienności dla danych kontroli w celu ustalenia, czy spełniają one dopuszczalne kryteria pod względem spójności z przewidywanymi wartościami historycznymi. Współczynniki zmienności, które przekraczają wartości współczynnika zmienności przedstawione w tabeli 1 (zob. pkt 25 i 26) w odniesieniu do każdej masy narządu powinny wskazywać, czy istnieją błędy w zapisie lub wprowadzaniu danych lub czy laboratorium osiągnęło już biegłość w przeprowadzaniu dokładnej sekcji tkanek zależnych od androgenów i czy uzasadnione jest zalecanie dalszych szkoleń/praktyki w tym zakresie. Zasadniczo współczynniki zmienności (odchylenie standardowe podzielone przez średnią masę narządu) są odtwarzalne w ramach różnych badań prowadzonych przez różne laboratoria. Przedstawione dane powinny obejmować co najmniej: dobrzuszny płat gruczołu krokowego, pęcherzyk nasienny, mięsień dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty, gruczoły Cowpera, żołądź, wątrobę i masy ciała oraz zmiany mas ciała od początku dawkowania aż do sekcji. Dane można przedstawić także po skorygowaniu kowariancji w odniesieniu do masy ciała, jednak nie powinno to zastępować przedstawienia danych nieskorygowanych. Ponadto jeżeli oddzielenie napletka nie wystąpiło w żadnej z grup, przypadek ten należy odnotować i porównać statystycznie z grupą kontrolną, stosując dokładny test Fishera.

▼**M5**

63. Sprawdzając wprowadzone dane komputerowe z oryginalnymi arkuszami danych pod względem dokładności, wartości masy narządów, które nie są biologicznie wiarygodne lub różnią się ponad trzema odchyleniami standardowymi od średniej w grupie badanej, należy dokładnie przeanalizować i ewentualnie rozważyć konieczność odrzucenia ich, ponieważ prawdopodobnie stanowią one błędy zapisu.

64. Porównanie wyników badań z wartościami współczynnika zmienności OECD (w tabeli 1) często jest ważnym krokiem w kierunku interpretacji w zakresie ważności wyników badań. Należy zachować dane historyczne dotyczące grup kontrolnych nośnika w laboratorium. Dane historyczne dotyczące reakcji na pozytywne substancje chemiczne odniesienia, takie jak propionat testosteronu i flutamid, również należy zachować w laboratorium. Laboratoria mogą także okresowo badać reakcję na działanie znanych słabych agonistów i antagonistów androgenów i przechowywać te dane. Dane te można porównać z dostępnymi danymi OECD, aby zapewnić statystyczną dokładność i moc metod stosowanych przez laboratorium.

▼M5

Dodatek 1

DEFINICJE:

Androgenny jest terminem stosowanym do określenia dodatniego wpływu na rozwój tkanek zależnych od androgenów.

Antyandrogenny oznacza zdolność substancji chemicznej do tłumienia działania propionatu testosteronu w organizmie ssaków.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Data urodzenia oznacza dzień 0 po urodzeniu.

Dawka oznacza ilość podawanej badanej substancji chemicznej. Do celów testu biologicznego Hershbergera dawkę wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej na jednostkową masę ciała zwierzęcia na dobę (np. mg/kg masy ciała/dobę).

Dawkowanie jest terminem ogólnym obejmującym dawkę, częstotliwość i czas trwania dawkowania.

Agonalny jest terminem stosowanym do określenia zwierzęcia w stanie śmierci, tj. zbliżającego się do momentu śmierci.

Dzień X po urodzeniu oznacza X-ty dzień życia od dnia urodzenia.

Czułość oznacza potencjał metody badawczej w zakresie poprawnego identyfikowania substancji chemicznych posiadających badaną właściwość.

Swoistość oznacza potencjał metody badawczej w zakresie poprawnego identyfikowania substancji chemicznych nieposiadających badanej właściwości.

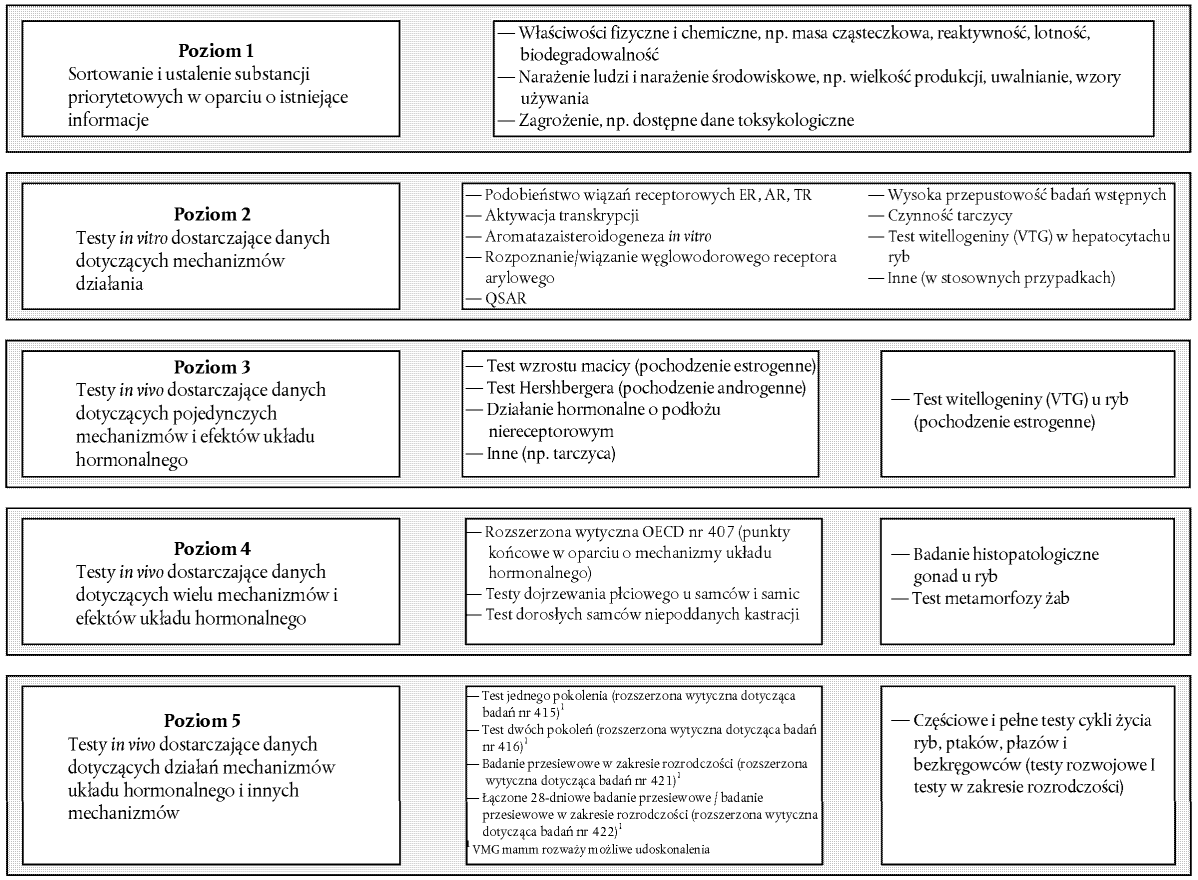
Badana substancja chemiczne oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

Walidacja oznacza proces naukowy opracowany w celu scharakteryzowania wymogów operacyjnych i ograniczeń metody badawczej oraz w celu przedstawienia jej wiarygodności i znaczenia w odniesieniu do poszczególnego celu.

Dodatek 2

Uwaga: Dokument sporządzony przez członków sekretariatu programu wytycznych dotyczących badań w oparciu o porozumienie osiągnięte na szóstym posiedzeniu grupy zadaniowej ds. badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego

Ramy koncepcyjne OECD w zakresie badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego



VMG mamm: zespół zarządzania walidacją ds. badań i oceny ssaków

▼**M5**

UWAGI DO POWYŻSZYCH RAM

Uwaga 1: Istnieje możliwośćrozpoczynania i rezygnacji na wszystkich poziomach i zależy to od charakteru istniejącego zapotrzebowania na informacje do celów oceny zagrożenia i ryzyka.

Uwaga 2: Na poziomie 5 w badaniach z zakresu ekotoksykologii należy zawrzeć punkty końcowe wskazujące mechanizmy niepożądanych skutków i potencjalne szkody dla populacji.

Uwaga 3: W przypadku gdy model multimodalny obejmuje kilka testów pojedynczych punktów końcowych, przedmiotowy model zastąpi stosowanie tych testów pojedynczych punktów końcowych.

Uwaga 4: Ocena każdej substancji chemicznej powinna opierać się na indywidualnych przypadkach, z uwzględnieniem wszystkich dostępnych informacji, mając na uwadze rolę poziomów powyższych ram koncepcyjnych.

Uwaga 5: Obecnie nie należy traktować powyższych ram koncepcyjnych jako wytycznych obejmujących wszystkie kwestie. Poziomy 3, 4 i 5 obejmują testy, które są dostępne lub w odniesieniu do których trwa proces walidacji. W odniesieniu do tej ostatniej kwestii testy te zostały tymczasowo włączone. Po ich opracowaniu i przeprowadzeniu walidacji zostaną oficjalnie dodane do ram koncepcyjnych.

Uwaga 6: Nie należy uznawać, że poziom 5 zawiera wyłącznie badania ostateczne. Uznaje się, że badania uwzględnione na tym poziomie przyczyniają się do ogólnej oceny zagrożenia i ryzyka.

LITERATURA

(1) OECD (1998), 'Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force', 10–11 marca 1998 r., ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman, R.I. (1962), *Standard methods adopted by official organization*,Academic Press, NY.

(3) Gray, L.E. Jr, Furr, J. i Ostby, J.S. (2005), 'Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rat.' [w:] *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 no. 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 5a-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories', *Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment No. 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 No. 73*, ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W., Zeiger, E., Walker, M., Ashby, J., Onyon, L., Gray, Jr, L.E. (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, L.E., 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 studiem', *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, G.S. (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, G.S., Elliott, H.W. (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 metod', *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175–180.

(14) Hilgar, A.G., Vollmer, E.P. (1964), *Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic*, Washington DC: United States Public Health Service.

(15) Dorfman, R.I. (1969). 'Androgens and anabolic agents', [w:] *Methods in Hormone Research, volume IIA,* (Dorfman, R.I., red.) New York: Academic Press, 151–220.

(16) Massaro, E.J. (2002), *Handbook of Neurotoxicology, volume I.* New York: Humana Press, s. 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), *Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju — Principles of Good Laboratory Practice*, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(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) Materiały uzupełniające do Owens i in. (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. Zob. sekcja II, wytyczne dotyczące przeprowadzania sekcji zapewniane laboratoriom, dostępne na stronie internetowej: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf.

(22) Korea Food and Drug Administration. Referencyjny przewodnik wizualny dotyczący procedury testu Hershbergera zawierający materiał wideo na temat sekcji. Dostępny na stronie internetowej: 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) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33).

(27) Następujące rozdziały niniejszego załącznika:

B.1 bis, toksyczność ostra pokarmowa — procedura z wykorzystaniem stałej dawki

B.1 ter, toksyczność ostra pokarmowa — metoda klas ostrej toksyczności

▼M5

B.56. **ROZSZERZONE BADANIE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCYJNEJ JEDNEGO POKOLENIA**

WPROWADZENIE

1. Opisywana metoda badawcza jest zgodna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 443 (2012 r.). Metoda ta opiera się na propozycji Międzynarodowego Instytutu Nauk Biologicznych (ILSI)-Instytutu Badań Środowiskowo-Zdrowotnych (HESI), Komitetu Technicznego ds. Oceny Bezpieczeństwa Chemicznego w Rolnictwie (ACSA) dotyczącej rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia na etapie życia pokolenia F_1, jak przedstawiono w publikacji Cooper i in., 2006 r. (1). W projekcie badania wprowadzono kilka ulepszeń i wyjaśnień, aby zapewnić elastyczność i podkreślić znaczenie wykorzystania z istniejącej wiedzy z jednoczesnym uwzględnieniem obserwacji na żywych zwierzętach w celu ukierunkowania i dostosowania badań. Przedmiotowa metoda badawcza zapewnia szczegółowy opis prowadzenia rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia. W ramach tej metody badawczej opisuje się trzy kohorty zwierząt z pokolenia F_1:

kohorta 1: ocena reprodukcyjnych/rozwojowych punktów końcowych; kohortę tę można rozszerzyć na pokolenie F_2,

kohorta 2: ocena potencjalnego wpływu narażenia na działanie substancji chemicznych na rozwijający się układ nerwowy,

kohorta 3: ocena potencjalnego wpływu narażenia na działanie substancji chemicznych na rozwijający się układ odpornościowy.

2. Decyzje dotyczące tego, czy przeprowadzić ocenę drugiego pokolenia i pominąć kohortę neurotoksyczności rozwojowej lub kohortę immunotoksyczności rozwojowej, powinny odzwierciedlać stan istniejącej wiedzy na temat substancji chemicznej podlegającej ocenie, a także potrzeby różnych organów regulacyjnych. Celem omawianej metody badawczej jest przedstawienie szczegółowych informacji o możliwych sposobach przeprowadzenia badania i wyjaśnienie, w jaki sposób należy oceniać każdą kohortę.

3. Procedura podejmowania decyzji dotyczącej wewnętrznego uruchamiania tworzenia drugiego pokolenia jest opisana w wytycznej OECD nr 117 (39) skierowanej do tych organów regulacyjnych, które stosują wewnętrzne czynniki uruchamiające.

USTALENIA WSTĘPNE I CELE

4. Głównym celem rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia jest ocena poszczególnych etapów życia nieobjętych innymi rodzajami badań toksyczności oraz zbadanie skutków, które mogą pojawić się w wyniku narażenia na działanie substancji chemicznych w okresie przed- i pourodzeniowym. W przypadku reprodukcyjnych punktów końcowych przewiduje się, że pierwszym krokiem jest wykorzystanie, w miarę dostępności, informacji z badań toksyczności dawki powtórzonej (w tym badań przesiewowych toksyczności reprodukcyjnej, np. wytyczna OECD nr 422 (32)) lub z krótkoterminowych badań przesiewowych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (np. test wzrostu macicy — metoda badawcza B.54 (36) i test Hershbergera — metoda badawcza B.55 (37)) w celu wykrycia wpływu na narządy rozrodcze samców i samic. Może to dotyczyć spermatogenezy (histopatologii jąder) w przypadku samców oraz cykli estrogenowych, liczby pęcherzyków jajnikowych/dojrzewania oocytów oraz integralności jajników (histopatologii) w przypadku samic. Rozszerzone badanie toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia służy zatem jako badanie reprodukcyjnych punktów końcowych, które wymagają interakcji samców z samicami, samic z jajem płodowym oraz samic z potomstwem i pokoleniem F_1 aż do osiągnięcia dojrzałości płciowej (zob. wytycza OECD nr 151 dotycząca tej metody badawczej (40)).

▼M5

5. Przedmiotowa metoda badawcza ma zapewnić ocenę przed- i pourodzeniowego wpływu działania substancji chemicznych na rozwój, a także dogłębną ocenę toksyczności ogólnoustrojowej u samic w okresie ciąży i laktacji oraz u młodego i dorosłego potomstwa. Oczekuje się, że szczegółowe badanie głównych rozwojowych punktów końcowych, takich jak żywotność potomstwa, zdrowie noworodków, stan rozwoju w momencie narodzin oraz rozwój fizyczny i funkcjonalny aż do osiągnięcia dorosłości, pozwoli zidentyfikować konkretne organy docelowe u potomstwa. Ponadto badanie pozwoli uzyskać lub potwierdzić informacje na temat wpływu badanej substancji chemicznej na integralność i funkcjonowanie układów rozrodczych dorosłych samców i samic. Pod uwagę brane są w szczególności, ale nie wyłącznie, następujące parametry: czynność gonad, cykl estrogenowy, dojrzewanie plemników w najądrzach, zachowanie kopulacyjne, zapłodnienie, ciąża, poród i laktacja. Ponadto informacje uzyskane z ocen neurotoksyczności rozwojowej i immunotoksyczności rozwojowej pozwolą scharakteryzować potencjalne oddziaływanie na te układy. Dane otrzymane z tych badań powinny umożliwiać określenie poziomów dawkowania, przy których nie obserwuje się szkodliwych zmian (poziomy NOAEL), najniższych poziomów, przy których obserwuje się szkodliwe zmiany (LOAEL), lub dawek wyznaczających dla różnych punktów końcowych lub powinny zostać wykorzystane w celu scharakteryzowania skutków wykrytych w poprzednich badaniach toksyczności dawki powtórzonej lub służyć jako wskazówki dla kolejnych badań.

6. Schemat protokołu przedstawiono na rysunku 1. Badaną substancję chemiczną podaje się w sposób ciągły w dawkach stopniowanych kilku grupom dojrzałych płciowo samców i samic. Przedmiotowe pokolenie rodzicielskie (P) otrzymuje dawkę przez ustalony okres poprzedzający krycie (wybrany na podstawie dostępnych informacji dla badanej substancji chemicznej; jednak przez co najmniej dwa tygodnie) oraz w trakcie dwutygodniowego okresu krycia. Samcom z pokolenia P nadal podaje się substancję przynajmniej do momentu odsadzenia pokolenia F_1. Należy im podawać substancję przez co najmniej 10 tygodni. Okres ten można wydłużyć, jeżeli zachodzi konieczność wyjaśnienia wpływu na reprodukcję. Samicom z pokolenia P podaje się substancję również w trakcie ciąży i laktacji aż do zakończenia badania po odsadzeniu miotu (tj. przez 8–10 tygodni). Potomstwo z pokolenia F_1 nadal otrzymuje badaną substancję chemiczną od momentu odsadzenia do osiągnięcia dorosłości. Jeżeli ocenie będzie poddane drugie pokolenie (zob. wytyczna OECD nr 117 (39)), potomstwo z pokolenia F_1 nadal będzie otrzymywało substancję aż do odsadzenia pokolenia F_2 lub do momentu zakończenia badania.

7. Wszystkie zwierzęta poddaje się obserwacjom klinicznym i badaniom patologicznym pod kątem oznak toksyczności, ze szczególnym uwzględnieniem integralności i funkcjonowania układów rozrodczych samców i samic oraz zdrowia, wzrostu, rozwoju i funkcji rozrodczych potomstwa. Po odsadzeniu wybrane potomstwo przydziela się do specjalnych podgrup (kohorty 1–3, zob. pkt 33 i 34 oraz rys. 1) w celu prowadzenia dalszych badań, w tym dotyczących dojrzałości płciowej, integralności i funkcji narządów rozrodczych oraz neurologicznych i behawioralnych punktów końcowych, a także funkcji odpornościowych.

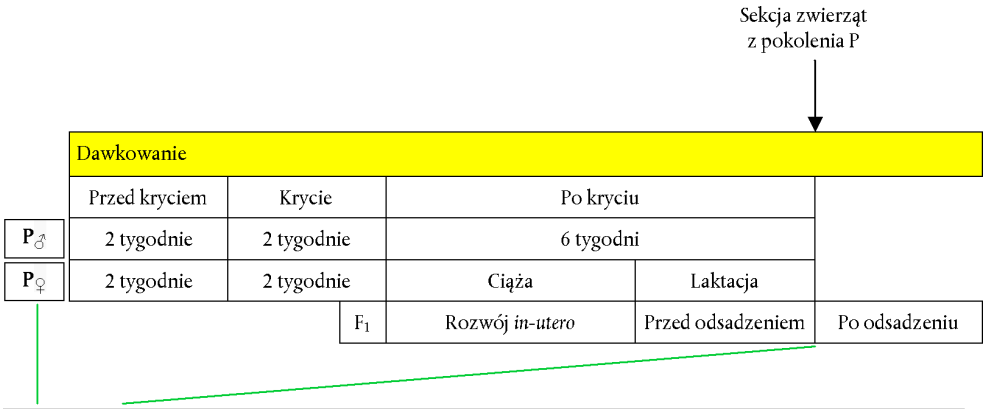
8. Przy prowadzeniu badania należy przestrzegać zasad i ustaleń określonych w dokumencie zawierającym wytyczne OECD nr 19 ‘Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations‘ (34) (Wytyczne dotyczące uznawania, oceny i wykorzystywania objawów klinicznych jako punktów humanitarnego zakończenia w odniesieniu do zwierząt doświadczalnych wykorzystywanych w ocenach bezpieczeństwa).

▼M5

9. Kiedy dostępna będzie wystarczająca liczba badań umożliwiająca ustalenie wpływu tego nowego projektu badania, przedmiotowa metoda badawcza zostanie poddana przeglądowi i w razie potrzeby poprawiona z uwzględnieniem zdobytych doświadczeń.

Rysunek 1

Schemat rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia



Pokolenie rodzicielskie	Kohorta	Oznaczenie	Zwierzęta/kohortę	Dojrzałość płciowa	Przybliżony wiek w momencie sekcji zwłok (w tygodniach)
Celem jest 20 miotów na grupę	1A	Toksyczność reprodukcyjna	20 M + 20 F	Tak	13
	1B	Toksyczność reprodukcyjna	20 M + 20 F	Tak	14 lub 20–25 w przypadku wywołania
	2A	Neurotoksyczność	10 M + 10 F @	Tak	11-12
	2B	Neurotoksyczność	10 M + 10 F @	Nie	3
	3	Immunotoksyczność	10 M + 10 F @	Tak	8
	Zwierzęta nieprzydzielone	Inne		Nie	3

@ jedno zwierzę na miot, w miarę możliwości reprezentatywne dla wszystkich 20 miotów

OPIS METODY/PRZYGOTOWANIA DO BADANIA

Zwierzęta

Wybór gatunków zwierząt i szczepu

10. Należy dokładnie rozważyć wybór gatunków do badania toksyczności reprodukcyjnej, uwzględniając wszystkie dostępne informacje. Ze względu na zakres danych kontekstowych i porównywalność z badaniami toksyczności ogólnej gatunkiem preferowanym jest jednak zazwyczaj szczur i do tego gatunku odnoszą się kryteria i zalecenia przedstawione w przedmiotowej metodzie badawczej. W przypadku wykorzystania innego gatunku należy przedstawić uzasadnienie i dokonać odpowiednich modyfikacji w protokole. Nie należy wykorzystywać szczepów o niskiej płodności i powszechnie znanej dużej częstości występowania samorzutnych wad rozwojowych.

Wiek, masa ciała i kryteria włączenia do badania

11. Należy wykorzystywać zdrowe zwierzęta rodzicielskie, których wcześniej nie poddawano procedurom badawczym. Należy objąć badaniem zarówno samce, jak i samice, przy czym samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. Zwierzęta z pokolenia P powinny być dojrzałe płciowo, o podobnej masie (w obrębie jednej płci) w momencie rozpoczęcia dawkowania, w podobnym wieku (około 90 dni) w momencie krycia oraz powinny być reprezentatywne dla danego gatunku i szczepu objętego badaniem. Po dostarczeniu do laboratorium zwierzęta należy poddać aklimatyzacji przez co najmniej 5 dni. Zwierzęta przydziela się losowo do grupy kontrolnej i grupy badanej w sposób, który zapewnia uzyskanie porównywalnych średnich wartości masy ciała między grupami (tj. ± 20 % średniej).

▼M5

Warunki trzymania i żywienia

12. Temperatura w pomieszczeniu badawczym powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Wilgotność względna powinna być na poziomie 30–70 %, najlepiej w zakresie od 50 do 60 %. Cykl sztucznego oświetlenia należy ustawić na 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne, zapewniając nieograniczony dostęp do wody pitnej. Należy zwrócić szczególną uwagę na zawartość fitoestrogenów w paszy, ponieważ ich wysoki poziom w paszy może mieć wpływ na niektóre reprodukcyjne punkty końcowe. Zaleca się standardowe pasze w otwartej formie użytkowej, w których zmniejszono zawartość substancji estrogennych (2)(30). Na wybór paszy może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej w przypadku podawania jej w ramach opisywanej metody. Należy zweryfikować skład, jednorodność i stabilność badanej substancji chemicznej w paszach. Paszę i wodę pitną należy regularnie badać na obecność zanieczyszczeń. Próbki każdej partii paszy użytej podczas badania należy przechowywać w odpowiednich warunkach (np. zamrożone w temperaturze – 20 °C) do momentu sporządzenia sprawozdania, na wypadek gdyby wyniki wymagały dalszej analizy składników paszy.

13. Zwierzęta należy umieścić w klatkach w małych grupach osobników tej samej płci i należących do tej samej grupy badanej. Zwierzęta można trzymać oddzielnie w celu uniknięcia potencjalnych obrażeń (np. samce po okresie krycia). Procedury krycia należy przeprowadzać w klatkach nadających się do tego celu. Po stwierdzeniu, że nastąpiła kopulacja, samice, które są prawdopodobnie zapłodnione, są umieszczane oddzielnie w klatkach porodowych lub matczynych, w których mają one dostęp do właściwych i określonych materiałów do budowy gniazda. Mioty trzyma się razem z matkami do odsadzenia. Zwierzęta z pokolenia F_1 należy trzymać w małych grupach osobników tej samej płci należących do tej samej grupy badanej od momentu odsadzenia aż do zakończenia badania. Jeżeli ma to uzasadnienie naukowe, zwierzęta mogą być trzymane oddzielnie. Poziom zawartości fitoestrogenów w wybranym materiale ściółkowym powinien być minimalny.

Liczba i identyfikacja zwierząt

14. Zasadniczo każda grupa badana i grupa kontrolna powinna składać się z wystarczającej liczby kojarzonych par, aby otrzymać co najmniej 20 zapłodnionych samic w każdej grupie dawkowania. Celem jest uzyskanie wystarczającej liczby ciąż, aby zapewnić znaczącą ocenę potencjalnego wpływu substancji chemicznej na płodność, ciążę i zachowania macierzyńskie w pokoleniu P oraz wzrost i rozwój potomstwa z pokolenia F_1 od momentu poczęcia, aż do osiągnięcia dojrzałości. Jeżeli nie zostanie uzyskana pożądana liczba zapłodnionych zwierząt, nie jest to równoznaczne z koniecznością unieważnienia badania i należy dokonać indywidulanej oceny każdego przypadku, biorąc pod uwagę potencjalny związek przyczynowy z badaną substancją chemiczną.

15. Przed rozpoczęciem dawkowania każdemu zwierzęciu z pokolenia P przydziela się niepowtarzalny numer identyfikacyjny. Jeżeli z danych historycznych zgromadzonych przez laboratorium wynika, że znaczna część samic może nie wykazywać regularnego (4- lub 5-dniowego) cyklu estrogenowego, wówczas zaleca się ocenę cykli estrogenowych przed rozpoczęciem dawkowania. Ewentualnie można zwiększyć liczebność grupy, aby zapewnić obecność w każdej grupie co najmniej 20 samic, które będą miały regularne (4- lub 5-dniowe) cykle estrogenowe w momencie rozpoczęcia dawkowania. Całe potomstwo z pokolenia F_1 identyfikuje się w sposób niepowtarzalny podczas pierwszego badania noworodków w dniu 0 lub 1 po urodzeniu. Przez cały okres trwania badania w odniesieniu do wszystkich zwierząt z pokolenia F_1 oraz, w stosownych przypadkach, z pokolenia F_2 należy prowadzić rejestr danych wskazujących na miot pochodzenia.

▼M5

Badana substancja chemiczna

Dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej

16. Przegląd istniejących informacji jest istotny przy podejmowaniu decyzji w sprawie drogi podawania, wyboru nośnika, wyboru gatunku zwierząt, wyboru dawkowania i potencjalnych modyfikacji schematu dawkowania. Dlatego też, planując rozszerzone badanie toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia, należy uwzględnić wszystkie dostępne istotne informacje na temat badanej substancji chemicznej, tj. właściwości fizykochemiczne, właściwości toksykokinetyczne (w tym dotyczące metabolizmu charakterystycznego dla danego gatunku), właściwości toksykodynamiczne, zależności struktura-aktywność, procesy metaboliczne *in vitro*, wyniki poprzednich badań toksyczności i istotne informacje na temat analogów strukturalnych. Wstępne informacje na temat wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania (ADME) oraz bioakumulacji można uzyskać na podstawie struktury chemicznej, danych fizykochemicznych, stopnia wiązania z białkami osocza lub badań toksykokinetycznych, natomiast wyniki badań toksyczności są źródłem dodatkowych informacji, np. dotyczących poziomu NOAEL, metabolizmu lub indukcji metabolizmu.

Uwzględnienie danych toksykokinetycznych

17. Chociaż nie jest to wymagane, dane toksykokinetyczne uzyskane z przeprowadzonych wcześniej badań służących wyznaczeniu zakresu dawki lub innych badań są niezwykle przydatne przy planowaniu projektu badania, wyborze dawki i interpretacji wyników. Szczególnie użyteczne są dane, które: 1) weryfikują narażenie rozwijających się płodów i młodych na działanie badanej substancji chemicznej (lub odpowiednich metabolitów); 2) zapewniają szacunek dozymetrii wewnętrznej; oraz 3) zapewniają ocenę potencjalnego zależnego od dawki nasycenia procesów kinetycznych. Należy również uwzględnić dodatkowe dane toksykokinetyczne, jeżeli są dostępne, takie jak profile metabolitów, przebieg stężenia w czasie itp. Uzupełniające dane toksykokinetyczne można również gromadzić w trakcie głównego badania, pod warunkiem że nie koliduje to z gromadzeniem i interpretacją punktów końcowych badania głównego.

Zgodnie z ogólną wytyczną w trakcie planowania rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia przydatny byłby następujący zestaw danych toksykokinetycznych:

— późny etap ciąży (np. dzień 20 ciąży) — krew matki i krew płodu,

— środkowy etap laktacji (dzień 10 po urodzeniu) — krew matki, krew młodego lub mleko,

— wczesny okres po odsadzeniu (np. dzień 28 po urodzeniu) — próbki krwi młodych po odsadzeniu.

Określając konkretne anality (np. pierwotną substancję chemiczną lub metabolity) i schemat pobierania próbek, należy zachować elastyczność. Na przykład liczba i czas pobierania próbek w danym dniu pobierania będą uzależnione od drogi narażenia i wcześniejszej wiedzy na temat właściwości toksykokinetycznych u zwierząt niecięża rnych. W przypadku badań, w których substancja badana podawana jest z paszą, wystarczające jest pobieranie próbek jednokrotnie o tej samej porze każdego dnia podawania substancji, podczas gdy dawkowanie przez sondę może wymagać dodatkowych pobrań próbek w celu uzyskania lepszego szacunku zakresu wewnętrznych dawek. Nie jest jednak konieczne uzyskanie pełnego przebiegu stężenia w czasie w żadnym z dni pobierania. W razie potrzeby krew można łączyć według płci w ramach miotów do celów analiz płodów i noworodków.

▼M5

Droga podawania

18. Przy wyborze drogi podania należy uwzględnić drogę lub drogi w największym stopniu powiązane z narażeniem ludzi. Mimo że protokół opracowano z myślą o podawaniu badanej substancji chemicznej z paszą, można go zmodyfikować w celu podawania substancji inną drogą (z wodą pitną, przez sondę, drogą wziewną, drogą naskórną) w zależności od cech charakterystycznych substancji i wymaganych informacji.

Wybór nośnika

19. W razie potrzeby badaną substancję chemiczną rozpuszcza się lub przygotowuje jako zawiesinę w odpowiednim nośniku. Zaleca się, aby w miarę możliwości przede wszystkim brać pod uwagę zastosowanie roztworu/zawiesiny w wodzie, a dopiero w dalszej kolejności roztworu/zawiesiny substancji w oleju (np. oleju kukurydzianym). W przypadku nośników innych niż woda właściwości toksyczne tego nośnika powinny być znane. Należy unikać stosowania nośników charakteryzujących się potencjalną swoistą toksycznością (np. aceton, sulfotlenek dimetylu). Należy oznaczyć stabilność badanej substancji chemicznej w nośniku. Jeżeli w celu ułatwienia dawkowania używa się nośnika lub innego dodatku, należy uwzględnić następujące cechy charakterystyczne: wpływ na wchłanianie, dystrybucję, metabolizm lub zatrzymywanie badanej substancji chemicznej; wpływ na właściwości chemiczne badanej substancji chemicznej, co może zmienić jej charakterystykę toksyczną; oraz wpływ na przyjmowanie pokarmu lub wody lub stan odżywienia zwierząt.

Wybór dawki

20. Zasadniczo w ramach badania należy podać co najmniej trzy dawki i zapewnić równoczesną kontrolę. Przy wyborze odpowiednich poziomów dawek badacz powinien uwzględnić wszystkie dostępne informacje, w tym informacje dotyczące dawkowania z poprzednich badań, dane toksykokinetyczne uzyskane w badaniach zwierząt ciężarnych lub nieciężarnych, zakres przenoszenia w trakcie laktacji i szacunki dotyczące narażenia ludzi. Jeżeli dostępne są dane toksykokinetyczne, które wskazują na zależne od dawki nasycenie procesów toksykokinetycznych, należy zachować ostrożność w celu uniknięcia wysokich dawek, które wyraźnie wskazują na nasycenie, oczywiście pod warunkiem że oczekuje się narażenia ludzi na poziomie znacznie niższym od punktu nasycenia. W takich przypadkach najwyższa dawka powinna odpowiadać punktowi przegięcia lub nieco przewyższać ten punkt w odniesieniu do przejścia na nielinearne zachowanie toksykokinetyczne.

21. W przypadku braku istotnych danych toksykokinetycznych dawki należy ustalać w oparciu o efekty toksyczne, chyba że są one ograniczone fizykochemicznymi właściwościami badanej substancji chemicznej. Jeżeli dawki określono na podstawie toksyczności, należy wybrać najwyższą dawkę w celu wywołania pewnej toksyczności ogólnoustrojowej, ale nie śmierci ani poważnego cierpienia zwierząt.

22. Należy dobrać malejącą sekwencję dawek w celu wykazania wszelkich zależności dawka-odpowiedź i ustalenia poziomów NOAEL lub dawek bliskich granicy wykrywalności, które pozwoliłyby określić dawkę wyznaczającą dla najbardziej wrażliwych punktów końcowych. Aby uniknąć dużych odstępów w podawaniu dawek między poziomami NOAEL i LOAEL, optymalne są często podwójne lub poczwórne odstępy. Dodanie czwartej grupy badanej jest często bardziej zalecane niż stosowanie bardzo dużych odstępów (np. współczynnik większy od 10) między dawkami.

23. Z wyjątkiem poddawania działaniu badanej substancji chemicznej zwierzęta w grupie kontrolnej traktuje się w identyczny sposób jak zwierzęta w grupie badanej. Grupa ta powinna stanowić grupę, której substancja nie jest podawana, lub grupę kontrolną poddaną terapii pozorowanej bądź grupę kontrolną nośnika, jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej stosowany jest nośnik. Jeżeli w badaniu używa się nośnika, grupa kontrolna powinna otrzymać największą zastosowaną objętość nośnika.

▼M5

Badanie graniczne

24. Jeżeli badania toksyczności dawki powtórzonej nie dają objawów toksyczności przy dawce co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała/dobę lub jeżeli nie przewiduje się objawów toksyczności na podstawie danych dotyczących substancji chemicznych powiązanych strukturalnie lub metabolicznie, wskazujących na podobieństwo w właściwościach metabolicznych *in vivo*/*in vitro,* badanie obejmujące kilka dawek może nie być konieczne. W takich przypadkach rozszerzone badanie toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia można przeprowadzić z wykorzystaniem grupy kontrolnej i pojedynczej dawki wynoszącej co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała/dobę. Gdyby jednak przy tej dawce granicznej uzyskano dowody na toksyczność rozrodczą lub rozwojową, wymagane byłoby przeprowadzenie dalszych badań przy niższych dawkach w celu zidentyfikowania poziomu NOAEL. Czynniki związane z badaniem granicznym mają zastosowanie wyłącznie wówczas, gdy narażenie ludzi nie wskazuje na konieczność zastosowania wyższej dawki.

PROCEDURY

Narażenie potomstwa

25. Narażenie na działanie substancji w paszy jest preferowaną metodą podawania. Jeżeli prowadzi się badania z wykorzystaniem sondy, należy pamiętać, że młode zwykle będą otrzymywały badaną substancję chemiczną tylko pośrednio przez mleko do momentu, aż rozpocznie się dawkowanie bezpośrednie po odsadzeniu. W badaniach, w których substancje podaje się z paszą lub wodą pitną, młode dodatkowo będą otrzymywały badaną substancję chemiczną bezpośrednio, gdy rozpoczną samodzielne odżywianie się w ostatnim tygodniu okresu laktacji. Należy rozważyć zmiany w projekcie badania, jeżeli wydzielanie badanej substancji chemicznej w mleku jest niewielkie oraz w przypadku braku dowodu na ciągłe narażenie potomstwa na działanie substancji. W takich przypadkach należy rozważyć bezpośrednie podawanie młodym dawki w okresie laktacji na podstawie dostępnych informacji toksykokinetycznych, toksyczności potomstwa lub zmian w biomarkerach (3)(4). Przed przeprowadzeniem badań polegających na bezpośrednim podawaniu dawek młodym pozostającym pod opieką matki należy starannie rozważyć korzyści i wady takiego rozwiązania (5).

Schemat dawkowania i podawanie dawek

26. Niektóre informacje na temat cyklów estrogenowych, histopatologii męskiego i żeńskiego układu rozrodczego oraz analizy plemników w jądrach/najądrzach można uzyskać z wcześniejszych badań toksyczności dawki powtórzonej trwających przez odpowiedni czas. Czas trwania podawania substancji w okresie poprzedzającym krycie w ramach rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia ma zatem na celu wykrycie wpływu na zmiany funkcjonalne, które mogą wpływać na zachowania kopulacyjne i zapłodnienie. Podawanie w okresie poprzedzającym krycie powinno być na tyle długie, aby osiągnąć stałe warunki narażenia u samców i samic z pokolenia P. W większości przypadków dwutygodniowe podawanie substancji w okresie poprzedzającym krycie uważa się za wystarczające dla obu płci. W przypadku samic taki okres obejmuje 3–4 pełne cykle estrogenowe i powinien być wystarczający, aby wykryć wszelkie niepożądane skutki dla cykliczności. W przypadku samców okres taki odpowiada czasowi, jaki jest wymagany do transportu dojrzewających plemników przez najądrza, i powinien pozwolić na wykrycie oddziaływania na plemniki po opuszczeniu jąder (w trakcie końcowych etapów spermiacji i dojrzewania plemników w najądrzach) podczas krycia. W momencie zakończenia badania, gdy planowana jest histopatologia jąder i najądrzy oraz analiza parametrów plemników, samce z pokolenia P i F_1 będą poddane działaniu substancji przez co najmniej jeden pełny cykl spermatogeniczny ((6)(7)(8)(9) i wytyczna OECD nr 151 (40)).

▼M5

27. Scenariusze narażenia na substancje w okresie poprzedzającym krycie, dotyczące samców, mogłyby zostać dostosowane, gdyby toksyczność w odniesieniu do jąder (upośledzenie spermatogenezy) lub wpływ na integralność plemników i ich funkcjonowanie zostały wyraźnie zidentyfikowane w trakcie wcześniejszych badań. Podobnie w przypadku samic znany wpływ badanej substancji chemicznej na cykl estrogenowy, a co za tym idzie na receptywność seksualną, może uzasadnić odmienne scenariusze narażenia na działanie substancji w okresie poprzedzającym krycie. W szczególnych przypadkach dopuszczalne może być rozpoczęcie podawania substancji samicom z pokolenia P dopiero po uzyskaniu rozmazu zawierającego plemniki (zob. wytyczna OECD nr 151 (40)).

28. Po ustaleniu okresu dawkowania w okresie poprzedzającym krycie badaną substancję chemiczną należy podawać zwierzętom stale przez 7 dni w tygodniu aż do sekcji. Substancję należy podawać wszystkim zwierzętom przy użyciu tej samej metody. Dawkowanie należy kontynuować w dwutygodniowym okresie krycia oraz, w przypadku samic z pokolenia P, przez cały okres ciąży i laktacji aż do dnia zakończenia badania po odsadzeniu. Samcom należy podawać substancję w taki sam sposób aż do zakończenia badania w momencie odsadzenia zwierząt z pokolenia F_1. W przypadku sekcji pierwszeństwo powinny mieć samice, które należy poddać sekcji w tym samym/podobnym dniu laktacji. Sekcję samców można rozłożyć na większą liczbę dni w zależności od możliwości laboratorium. Bezpośrednie podawanie dawki samcom i samicom z pokolenia F_1 powinno rozpocząć się w momencie odsadzenia i powinno trwać aż do zaplanowanej sekcji, w zależności od przydziału do danej kohorty, chyba że dawkowanie rozpoczęło się już w okresie laktacji.

29. W przypadku substancji chemicznych podawanych z paszą lub wodą pitną należy dopilnować, aby ilości podawanej badanej substancji chemicznej nie zakłócały zwykłego odżywiania lub równowagi wodnej. Jeżeli badana substancja chemiczna podawana jest z paszą, można zastosować stałe stężenie w paszy (ppm) lub stałą dawkę w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia; należy określić wybrany wariant.

30. W przypadku podawania badanej substancji chemicznej przez sondę ilość podawanego jednorazowo płynu nie powinna zazwyczaj przekraczać 1 ml/100 g masy ciała (0,4 ml/100 g masy ciała stanowi maksymalną ilość w przypadku oleju, np. oleju kukurydzianego). Z wyjątkiem substancji chemicznych o działaniu drażniącym lub żrącym, które zwykle nasila się w wyższych stężeniach, należy minimalizować zmienność objętości badanej substancji dzięki korygowaniu stężenia w celu zapewnienia stałej objętości przy wszystkich dawkach. Substancję należy podawać o podobnej porze każdego dnia. Dawkę podawaną każdemu zwierzęciu należy zwykle określać na podstawie ostatniego pomiaru indywidualnej masy ciała i dostosowywać co najmniej raz w tygodniu w przypadku dorosłych samców i dorosłych niecięża rnych samic oraz co dwa dni w przypadku ciężarnych samic i zwierząt z pokolenia F_1, jeżeli dawkę podaje się przed odsadzeniem i przez 2 tygodnie po odsadzeniu. Jeżeli dane toksykokinetyczne wskazują na niskie przenikanie badanej substancji chemicznej przez łożysko, dawka podawana przez sondę w ostatnim tygodniu ciąży może wymagać dostosowania w celu uniknięcia podania matce nadmiernie toksycznej dawki. W dniu porodu samicom nie należy podawać substancji przez sondę ani żadną inną drogą podania wymagającą opieki nad zwierzęciem; pominięcie podania badanej substancji chemicznej w tym dniu jest preferowane w celu uniknięcia zakłócenia procesu porodu.

▼M5

Krycie

31. Każdą samicę z pokolenia P należy umieścić z jednym, losowo wybranym i niespokrewnionym z nią samcem z tej samej grupy dawkowania (kojarzenie 1:1) aż do momentu zaobserwowania, że nastąpiła kopulacja, lub na okres 2 tygodni. Jeżeli liczba samców jest niewystarczająca, na przykład na skutek śmierci samców przed kojarzeniem, wówczas można kojarzyć samca lub samce, które już pokryły jedną samicę (1:1), z kolejną samicą lub kolejnymi samicami, tak aby wszystkie samice zostały skojarzone. Dzień 0 ciąży określa się jako dzień, w którym potwierdzono wystąpienie krycia (wykrycie w pochwie czopu nasienia lub plemników). Po zaobserwowaniu, że nastąpiła kopulacja, zwierzęta należy jak najszybciej rozdzielić. Jeżeli po upływie 2 tygodni krycie nie nastąpi, zwierzęta należy rozdzielić bez kolejnej możliwości krycia. W danych należy dokładnie zidentyfikować kojarzone pary.

Liczebność miotu

32. W dniu 4 po urodzeniu liczebność każdego miotu można dostosować przez wyeliminowanie dodatkowych młodych za pomocą doboru losowego, aby uzyskać, w miarę możliwości, liczebność jednego miotu wynoszącą pięć samców i pięć samic. Selektywna eliminacja młodych, np. oparta na masie ciała, jest nieodpowiednia. Ilekroć liczba młodych samców lub samic uniemożliwia uzyskanie pięciu osobników każdej płci na miot, dopuszczalne jest częściowe dostosowanie (na przykład sześć samców i cztery samice).

Dobór młodych do badań w okresie poodsadzeniowym (zob. rys. 1)

33. W momencie odsadzenia (około dnia 21 po urodzeniu) spośród młodych z wszystkich dostępnych miotów wybiera się do 20 zwierząt na grupę dawkowania i grupę kontrolną w celu prowadzenia dalszych badań i utrzymuje aż do osiągnięcia dojrzałości płciowej (chyba że wymagane są wcześniejsze badania). Młode dobiera się losowo, z wyjątkiem ewidentnie słabowitych osobników (zwierzęta o masie ciała o ponad dwa odchylenia standardowe niższej od średniej masy ciała młodego w danym miocie), których nie należy włączać do badania, ponieważ jest mało prawdopodobne, że będą one reprezentatywne dla grupy badanej.

W dniu 21 po urodzeniu wybrane młode z pokolenia F_1 przydziela się losowo do jednej z trzech kohort zwierząt w następujący sposób:

kohorta 1 (1A i 1B) = badanie toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej,

kohorta 2 (2A i 2B) = badanie neurotoksyczności rozwojowej,

kohorta 3 = badanie immunotoksyczności rozwojowej.

Kohorta 1A: jeden samiec i jedna samica/miot/grupę (20/płeć/grupę): dobór priorytetowy do celów podstawowej oceny wpływu na układy rozrodcze i oceny toksyczności ogólnej.

Kohorta 1B: jeden samiec i jedna samica/miot/grupę (20/płeć/grupę): dobór priorytetowy do celów oceny uzupełniającej zdolności reprodukcyjnej u zwierząt z pokolenia F_1 w okresie krycia, w momencie poddawania ocenie (zob. wytyczna OECD nr 117 (39)) oraz do celów uzyskania dodatkowych danych histopatologicznych w przypadkach substancji potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu rozrodczego lub hormonalnego, lub gdy wyniki z kohorty 1A są niejednoznaczne.

Kohorta 2A: łącznie 20 młodych na grupę (10 samców i 10 samic na grupę; jeden samiec lub jedna samica na miot) przydzielonych do badań neurobehawioralnych, a następnie poddanych ocenie neurohistopatologicznej jako osobniki dorosłe.

Kohorta 2B: łącznie 20 młodych na grupę (10 samców i 10 samic na grupę; jeden samiec lub jedna samica na miot) przydzielonych do oceny neurohistopatologicznej w momencie odsadzenia (dzień 21 po urodzeniu lub dzień 22 po urodzeniu). W przypadku niewystarczającej liczby zwierząt preferuje się przydzielenie zwierząt do kohorty 2A.

▼M5

Kohorta 3: łącznie 20 młodych na grupę (10 samców i 10 samic na grupę; jedno na miot, w miarę możliwości). Wymagane mogą być dodatkowe młode z grupy kontrolnej jako zwierzęta kontrolne dodatnie w teście reakcji przeciwciał zależnej od limfocytów T w dniu 56 ± 3 po urodzeniu.

34. Gdyby liczba młodych w miocie okazała się niewystarczająca, aby zapełnić wszystkie kohorty, pierwszeństwo przysługuje kohorcie 1, ponieważ można ją rozszerzyć w celu utworzenia pokolenia F_2. W przypadku szczególnych wątpliwości, np. jeżeli podejrzewa się, że substancja chemiczna jest substancją o działaniu neurotoksycznym, immunotoksycznym lub zaburzającą funkcjonowanie układu rozrodczego, do każdej z kohort można przydzielić dodatkowe młode. Takie młode można wykorzystać do badań w różnych punktach czasowych lub do oceny uzupełniających punktów końcowych. Młode nieprzydzielone do kohort zostaną poddane biochemii klinicznej (pkt 55) i pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu (pkt 68).

Drugie krycie zwierząt z pokolenia P

35. W przypadku zwierząt z pokolenia P zwykle nie zaleca się drugiego krycia, ponieważ odbywałoby się ono kosztem utraty ważnych informacji na temat liczby obszarów zagnieżdżenia (i w związku z tym danych dotyczących straty poimplementacyjnej i okołoporodowej, będących wskaźnikami możliwego potencjału teratogennego) w odniesieniu do pierwszego miotu. Z punktu widzenia konieczności weryfikacji lub wyjaśnienia wpływu na samice poddane działaniu substancji odpowiedniejsze byłoby rozszerzenie badania w taki sposób, aby obejmowało ono krycie pokolenia F_1. Drugie krycie samców z pokolenia P z samicami niepoddanymi działaniu substancji zawsze stanowi jednak rozwiązanie pozwalające wyjaśnić niejednoznaczne wyniki lub może służyć do dalszej charakterystyki wpływu na płodność zaobserwowanego w pierwszym kryciu.

OBSERWACJE NA ŻYWYCH ZWIERZĘTACH

Obserwacje kliniczne

36. Ogólną obserwację kliniczną zwierząt z pokolenia P i wybranych zwierząt z pokolenia F_1 przeprowadza się raz dziennie. W przypadku dawkowania przez sondę obserwacje kliniczne należy przeprowadzać przed rozpoczęciem i po zakończeniu dawkowania (w celu wykrycia możliwych oznak toksyczności związanych z najwyższym stężeniem w osoczu). Rejestruje się mające związek z badaniem zmiany w zachowaniu, objawy trudnego lub długotrwałego porodu oraz wszelkie oznaki toksyczności. Dwa razy dziennie, a w weekend raz dziennie, obserwuje się wszystkie zwierzęta pod kątem ostrej toksyczności, zachorowalności i śmiertelności.

37. Ponadto co tydzień przeprowadza się bardziej szczegółowe badanie wszystkich zwierząt z pokoleń P i F_1 (po odsadzeniu) i najlepiej byłoby je przeprowadzać przy okazji ważenia zwierzęcia, co zminimalizowałoby jego stres związany z tymi działaniami. Należy starannie prowadzić obserwacje i rejestrować ich wyniki za pomocą systemu punktowego określonego przez dane laboratorium badawcze. Należy dołożyć starań, aby różnice w warunkach badania były minimalne. Odnotowane objawy powinny obejmować między innymi zmiany w skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin i wydalin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego (np. łzawienie, piloreksja, rozmiar źrenicy, zmieniony rytm oddychania). Należy także rejestrować zmiany w sposobie chodzenia, postawie, reakcji na kontakt, a także obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, stereotypii (np. nadmiernego czyszczenia się, powtarzanego kręcenia się) lub dziwnych zachowań (np. samookaleczania, chodzenia do tyłu).

▼M5

Masa ciała i spożycie pokarmu/wody

38. Osobniki z pokolenia P waży się w pierwszym dniu dawkowania, a potem co najmniej raz w tygodniu. Ponadto samice z pokolenia P waży się w okresie laktacji w tych samych dniach, w których odbywa się ważenie młodych z ich miotów (zob. pkt 44). Wszystkie zwierzęta z pokolenia F_1 waży się osobno przy odsadzeniu (dzień 21 po urodzeniu), a potem co najmniej raz w tygodniu. Masę ciała rejestruje się także w dniu, w którym zwierzęta osiągną dojrzałość płciową (dzień pełnego oddzielenia napletka lub otwarcia pochwy). Wszystkie zwierzęta waży się przy uśmierceniu.

39. W trakcie badania spożycie pokarmu i wody (w przypadku podawania badanej substancji chemicznej w wodzie pitnej) rejestruje się co najmniej raz w tygodniu w tych samych dniach, w których dokonuje się pomiaru masy ciała zwierząt (z wyłączeniem okresu wspólnego przebywania w klatce). Spożycie pokarmu przez osobniki z pokolenia F_1 z każdej klatki rejestruje się co tydzień, począwszy od doboru zwierząt do poszczególnych kohort.

Cykle estrogenowe

40. Wstępne informacje na temat wpływu badanej substancji chemicznej na cykl estrogenowy mogą być już dostępne z poprzednich badań toksyczności dawki powtórzonej i można je wykorzystać przy opracowywaniu protokołu dla badanej substancji chemicznej w odniesieniu do rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia. Zazwyczaj ocena cykliczności estrogenowej (za pomocą cytologii pochwy) rozpoczyna się na początku okresu podawania substancji i trwa do uzyskania potwierdzenia, że nastąpiło krycie, lub do zakończenia dwutygodniowego okresu krycia. Jeżeli samice zostały zbadane pod kątem zwykłych cykli estrogenowych przed podaniem substancji, wówczas przydatne jest kontynuowanie pobierania wymazów po rozpoczęciu badania, ale jeżeli istnieje obawa o wystąpienie niespecyficznych skutków na początku podawania substancji (takich jak początkowy znaczny spadek spożycia pokarmu), wówczas można dać zwierzętom czas do dwóch tygodni na przystosowanie się do podawania przed rozpoczęciem dwutygodniowego okresu pobierania wymazów poprzedzającego kojarzenie. Jeżeli okres podawania substancji samicom został przedłużony w ten sposób (tj. do czterotygodniowego okresu podawania substancji przed okresem krycia), wówczas należy rozważyć nabycie młodszych osobników i wydłużenie okresu podawania substancji samcom przed kojarzeniem. Pobierając komórki z pochwy/szyjki, należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć uszkodzenia błony śluzowej i, w następstwie, wywołania ciąży rzekomej (10)(11).

41. Wymazy z pochwy pochodzące od wszystkich samic z pokolenia F_1 w kohorcie 1A należy badać codziennie od momentu otwarcia pochwy aż do zarejestrowania pierwszego wymazu zawierającego komórki zrogowaciałe w celu określenia odstępu czasowego między tymi dwoma zdarzeniami. Należy również monitorować cykle estrogenowe u wszystkich samic z pokolenia F_1 w kohorcie 1A przez okres dwóch tygodni, począwszy od około dnia 75 po urodzeniu. Ponadto, w przypadku konieczności krycia osobników z pokolenia F_1, cytologię pochwy samic z kohorty 1B wykonuje się od momentu kojarzenia aż do uzyskania potwierdzenia, że nastąpiło krycie.

Krycie i ciąża

42. Oprócz standardowych punktów końcowych (np. masa ciała, spożycie pokarmu, obserwacje kliniczne obejmujące kontrole śmiertelności/zachorowalności) rejestruje się daty kojarzenia, datę inseminacji i datę porodu oraz oblicza się przerwę w kopulacji (od momentu kojarzenia do inseminacji) i okres ciąży (od momentu inseminacji do porodu). W czasie przewidywanego porodu należy uważnie zbadać samice z pokolenia P pod kątem jakichkolwiek objawów dystocji. Należy rejestrować wszelkie nietypowe zachowania związane z budową gniazda i opieką.

▼M5

43. Dzień, w którym następuje poród, jest jednocześnie dniem 0 laktacji dla matki i dniem 0 po urodzeniu dla potomstwa. Ewentualnie podstawą wszystkich porównań może być również czas po kopulacji, aby uniknąć pomylenia danych dotyczących rozwoju pourodzeniowego, które są spowodowane różnicami w czasie trwania ciąży, należy jednak również zarejestrować czas związany z porodem. Jest to niezwykle ważne w przypadku, gdy badana substancja chemiczna wywiera wpływ na czas trwania ciąży.

Parametry potomstwa

44. Każdy miot należy zbadać po porodzie tak szybko, jak to możliwe (w dniu 0 po urodzeniu lub w dniu 1), aby ustalić liczbę młodych i ich płeć, martwe urodzenia, żywe urodzenia i obecność wyraźnych anomalii (widoczne z zewnątrz nieprawidłowości, w tym rozszczep podniebienia, krwotok podskórny, nietypowy kolor skóry lub nietypowa tekstura skóry, obecność pępowiny, brak mleka w żołądku, obecność suchych wydzielin). Ponadto pierwsze badanie kliniczne noworodków powinna obejmować ocenę jakościową temperatury ciała, stanu ich aktywności i reakcji na kontakt. Młode, które zmarły w dniu 0 po urodzeniu lub później, powinny zostać zbadane pod kątem możliwych wad i przyczyny śmierci. Żywe młode są liczone i ważone oddzielnie w dniu 0 lub 1 po urodzeniu, a następnie regularnie, np. co najmniej w dniach 4, 7, 14 i 21 po urodzeniu. Badania kliniczne, stosowne do wieku zwierząt, należy powtarzać przy ważeniu zwierząt lub częściej, jeżeli przy urodzeniu poczyniono szczególne ustalenia dla danego przypadku. Odnotowane objawy mogą między innymi obejmować nieprawidłowości zewnętrze, zmiany w skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin i wydalin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego. Należy także zarejestrować zmiany w sposobie chodzenia, postawie, reakcji na kontakt oraz obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, stereotypii lub dziwnych zachowań.

45. Pomiar odległości anogenitalnej u każdego młodego należy przeprowadzić co najmniej raz między dniem 0 a dniem 4 po urodzeniu. W dniu pomiaru odległości anogenitalnej należy dokonać pomiaru masy ciała młodego, a odległość anogenitalną należy znormalizować w odniesieniu do pomiaru wielkości młodego, najlepiej jako pierwiastek kwadratowy z masy ciała (12). W dniu 12 lub 13 po urodzeniu należy skontrolować obecność brodawek sutkowych/otoczek brodawek sutkowych u młodych samców.

46. Wszystkie wybrane osobniki z pokolenia F_1 bada się codziennie pod kątem oddzielenia napletka u samców lub otwarcia pochwy u samic, rozpoczynając przed przewidywanym dniem wystąpienia tych punktów końcowych, tak aby wykryć przypadki wcześniejszego osiągnięcia dojrzałości płciowej. Należy odnotować wszelkie nieprawidłowości narządów układu rozrodczego, takie jak trwała przegroda pochwy, spodziectwo lub żołądź rozszczepiona. Dojrzałość płciową osobników z pokolenia F_1 porównuje się z rozwojem fizycznym, określając wiek i masę ciała w momencie oddzielenia napletka u samców lub otwarcia pochwy u samic (13).

Ocena potencjalnej neurotoksyczności rozwojowej (kohorty 2A i 2B)

47. Do oceny neurotoksyczności należy wykorzystać 10 samców i 10 samic spośród zwierząt z kohorty 2A oraz 10 samców i 10 samic spośród zwierząt z kohorty 2B z każdej grupy badanej (w odniesieniu do każdej kohorty: 1 samiec i 1 samica na miot; wszystkie mioty są reprezentowane przez co najmniej jedno młode; dobór losowy). Zwierzęta z kohorty 2A należy poddać ocenie reakcji na nagły dźwięk, zestawowi badań funkcjonalno-obserwacyjnych, ocenie aktywności ruchowej (zob. pkt 48–50) i ocenie neuropatologicznej (zob. pkt 74–75). Należy dołożyć starań, aby różnice we wszystkich warunkach badania były minimalne i niepowiązane systematycznie z podawaniem. Do zmiennych, które mogą wpłynąć

▼M5

na zachowanie, należą: poziom dźwięku (np. przerywany hałas), temperatura, wilgotność, oświetlenie, zapachy, pora dnia i zakłócenia środowiskowe. Wyniki testów neurotoksyczności należy interpretować w odniesieniu do odpowiednich historycznych zakresów referncyjnych kontroli. Zwierzęta z kohorty 2B należy wykorzystać do oceny neuropatologicznej w dniu 21 lub 22 po urodzeniu (zob. pkt 74–75).

48. W dniu 24 po urodzeniu (± 1 dzień) należy przeprowadzić badanie reakcji na nagły dźwięk, wykorzystując zwierzęta z kohorty 2A. Dzień badania powinien być równomiernie podzielony między grupy badane i grupy kontrolne. Każda sesja składa się z 50 prób. Przy przeprowadzaniu badania reakcji na nagły dźwięk należy ustalić średnią amplitudę reakcji dla każdego bloku obejmującego 10 prób (5 bloków po 10 prób), przy czym warunki badania optymalizuje się, aby uzyskać habituację w trakcie jednej sesji. Opisywane procedury powinny być spójne z metodą badawczą B.53 (35).

49. W odpowiednim czasie między dniem 63 a 75 po urodzeniu zwierzęta z kohorty 2A poddaje się zestawowi badań funkcjonalno-obserwacyjnych i automatycznemu badaniu aktywności ruchowej. Procedury te powinny być spójne z metodami badawczymi B.43 (33) i B.53 (35). Zestaw badań funkcjonalno-obserwacyjnych obejmuje dogłębny opis wyglądu zewnętrznego podmiotu, jego zachowań i integralności funkcjonalnej. Ocenę taką uzyskuje się przez obserwacje zwierząt w klatkach macierzystych, obserwacje zwierząt po przeniesieniu na znormalizowaną powierzchnię do obserwacji (otwartą przestrzeń), gdzie zwierzęta mogą się swobodnie poruszać, i przez badania manipulacyjne. Badania powinno się przeprowadzać w kolejności od najmniej do najbardziej interaktywnych. Wykaz pomiarów przedstawiono w dodatku 1. Obserwacje wszystkich zwierząt powinni prowadzić wyszkoleni obserwatorzy, którzy nie mają wiedzy na temat tego, czy zwierzętom podawana jest substancja, i którzy stosują standardowe procedury w celu ograniczenia do minimum zmienności między obserwatorami. Zaleca się, aby w miarę możliwości ten sam obserwator przeprowadzał oceny zwierząt w ramach danego badania. Jeżeli nie jest to możliwe, wymagane jest udowodnienie wiarygodności ocen między obserwatorami. W odniesieniu do każdego parametru z zestawu badań behawioralnych należy stosować wyraźnie określone zakresy operacyjne i kryteria przyznawania punktów. W miarę możliwości należy opracować obiektywne pomiary ilościowe w odniesieniu do obserwowanych punktów końcowych, które obejmują klasyfikację subiektywną. Każde zwierzę jest badane oddzielnie pod kątem aktywności ruchowej. Sesja badawcza powinna być na tyle długa, aby wykazać w jej trakcie habituację grup kontrolnych. Należy monitorować aktywność ruchową za pomocą automatycznego sprzętu do rejestrowania aktywności, który powinien być w stanie wykryć zarówno wzrost, jak i obniżenie aktywności (tj. podstawowy poziom aktywności mierzony przez urządzenie nie powinien być tak niski, aby uniemożliwić wykrycie obniżenia aktywności, ani tak wysoki, aby uniemożliwić wykrycie jej wzrostu). Każde urządzenie powinno zostać przetestowane w ramach standardowych procedur, aby zapewnić na ile to tylko możliwe niezawodność działania poszczególnych urządzeń w poszczególnych dniach. Na ile to możliwe grupy badane powinny zostać przydzielone równomiernie do poszczególnych urządzeń. Należy równomiernie dostosować grupy badane do pór badania, aby uniknąć zakłócenia wywołanego okołodobowym rytmem aktywności biologicznej.

50. Jeżeli istniejące informacje wskazują na potrzebę przeprowadzenia innych badań funkcjonalnych (np. sensorycznych, społecznych, poznawczych), należy je włączyć do badań, nie naruszając integralności pozostałych ocen przeprowadzanych w ramach badania. Jeżeli badania te przeprowadza się na tych samych zwierzętach, które wykorzystano do badania reakcji na nagły dźwięk, zestawu badań funkcjonalno-obserwacyjnych i badań aktywności ruchowej, wówczas należy zaplanować różne badania, aby zminimalizować ryzyko naruszenia integralności tych badań. Procedury uzupełniające mogą być szczególnie użyteczne w przypadkach, gdy obserwacje empiryczne, przewidywane skutki lub mechanizm/sposób działania wskazują na jakiś szczególny rodzaj neurotoksyczności.

▼M5

Ocena potencjalnej immunotoksyczności rozwojowej (kohorta 3)

51. W dniu 56 po urodzeniu (± 3 dni) 10 samców i 10 samic spośród zwierząt z kohorty 3 z każdej grupy badanej (1 samiec lub 1 samica na miot; wszystkie mioty reprezentuje co najmniej jedno młode; dobór losowy) należy poddać testowi reakcji przeciwciał zależnej od limfocytów T, tj. reakcji pierwszorzędowych przeciwciał IgM na antygen zależny od limfocytów T, np. erytrocyty owcy (SRBC) lub hemocyjanina ślimaka morskiego (KLH), zgodnie z aktualnymi procedurami badawczymi dotyczącymi immunotoksyczności (14)(15). Reakcję można ocenić, licząc swoiste komórki tworzące łysinki w śledzionie lub ustalając miano przeciwciał IgM swoistych dla SRBC lub KLH w surowicy za pomocą testu ELISA w szczytowym momencie reakcji. Reakcje zwykle osiągają moment szczytowy w czwartym (w przypadku reakcji komórek tworzących łysinki) lub piątym (w przypadku testu ELISA) dniu po immunizacji drogą dożylną. Jeżeli reakcję przeciwciała pierwszorzędowego bada się, licząc komórki tworzące łysinki, dopuszcza się ocenę podgrup zwierząt w odrębne dni, pod warunkiem że: immunizacja i uśmiercanie podgrupy przebiegają w wyznaczonym czasie, dzięki czemu komórki tworzące łysinki są liczone w szczytowym momencie reakcji; że podgrupy składają się z równej liczby samców i samic z potomstwa ze wszystkich grup dawkowania, w tym grup kontrolnych; oraz że podgrupy ocenia się w mniej więcej tym samym wieku pourodzeniowym.Poddawanie działaniu badanej substancji chemicznej będzie kontynuowane aż do dnia poprzedzającego pobranie śledzion na potrzeby badania reakcji komórek tworzących łysinki lub surowicy do testu ELISA.

Ocena uzupełniająca potencjalnej toksyczności reprodukcyjnej (kohorta 1B)

52. Zwierzęta z kohorty 1B mogą być dalej objęte podawaniem po dniu 90 po urodzeniu i hodowane w celu uzyskania pokolenia F_2, jeżeli jest to konieczne. Samce i samice z tej samej grupy dawkowania powinny być trzymane razem (ale należy unikać kojarzenia rodzeństwa) przez okres do dwóch tygodni, który należy rozpocząć najwcześniej w dniu 90 po urodzeniu, ale nie później niż w dniu 120 po urodzeniu. Procedury powinny być podobne do tych dotyczących zwierząt z pokolenia P. Na podstawie wagi dowodów wystarczające może być jednak uśmiercenie miotów w dniu 4 po urodzeniu, zamiast ich hodowania do odsadzenia lub dłużej.

OBSERWACJE NA KONIEC BADANIA

Biochemia kliniczna/hematologia

53. Należy monitorować skutki ogólnoustrojowe u zwierząt z pokolenia P. Próbki krwi pobiera się na czczo z określonego miejsca od dziesięciu losowo dobranych samców i samic z pokolenia P na grupę dawkowania na koniec badania, przechowuje się w odpowiednich warunkach i poddaje częściowej lub całkowitej hematologii, biochemii klinicznej, testowi na T4 i TSH lub innym badaniom sugerowanym przez znany profil skutków badanej substancji chemicznej (zob. dokument zawierający wytyczne OECD nr 151 (40)). Należy zbadać następujące parametry hematologiczne: hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczbę erytrocytów, liczbę leukocytów i różnicowanie leukocytów, liczbę płytek krwi i czas krzepnięcia krwi/potencjał krzepliwości. Badania osocza lub surowicy powinny obejmować: cukier, cholesterol całkowity, mocznik, kreatyninę, białko całkowite, albuminę i co najmniej dwa enzymy wskazujące na stan komórek wątroby (takie jak aminotransferaza alaninowa, aminotransferaza asparaginianowa, fosfataza alkaliczna, gamma-glutamylotranspeptydaza i dehydrogenaza sorbitolu). Pomiary dodatkowych enzymów i kwasów żółciowych mogą w pewnych okolicznościach dostarczyć przydatnych informacji. Ponadto można pobrać krew od wszystkich zwierząt i przechowywać ją do możliwej analizy w późniejszym terminie, aby pomóc rozwiać wątpliwości

▼M5

w przypadku uzyskania niejednoznacznych wyników lub wygenerować dane dotyczące narażenia wewnętrznego. Jeżeli nie planuje się drugiego krycia zwierząt z pokolenia P, pobiera się próbki krwi tuż przed procedurą lub w ramach zaplanowanego uśmiercenia. W przypadku zachowania zwierząt próbki krwi należy pobrać kilka dni przed drugim kryciem zwierząt. O ile istniejące dane pochodzące z badań toksykologicznych dawki powtórzonej nie wskazują, że badana substancja chemiczna nie ma wpływu na parametr, przed uśmierceniem należy przeprowadzić badanie moczu oraz ocenić następujące parametry: wygląd zewnętrzny, objętość, osmolalność lub masę właściwą, pH, białko, cukier, krew i krwinki, szczątki komórek. Mocz można także pobierać w celu monitorowania wydalania badanej substancji chemicznej lub jej metabolitów.

54. Skutki ogólnoustrojowe należy również monitorować u zwierząt z pokolenia F_1. Próbki krwi pobiera się na czczo z określonego miejsca od dziesięciu losowo dobranych samców i samic z kohorty 1A na grupę dawkowania na koniec badań, przechowuje się w odpowiednich warunkach i poddaje standardowej biochemii klinicznej, w tym ocenie poziomów surowicy w odniesieniu do hormonów tarczycy (T4 i TSH), hematologii (liczba leukocytów i różnicowanie leukocytów oraz liczba erytrocytów) oraz badaniu moczu.

55. W dniu 4 po urodzeniu młode nieprzydzielone do żadnej kohorty obejmuje się pełnym rozpoznaniem histopatologicznym oraz rozważa się pomiar stężeń hormonu tarczycy (T4) w surowicy. W razie potrzeby krew noworodków (w dniu 4 po urodzeniu) można łączyć według miotów na potrzeby analizy biochemicznej/hormonu tarczycy. Krew pobiera się także do celów analizy T4 i TSH od osobników odsadzanych objętych pełnym rozpoznaniem histopatologicznym w dniu 22 po urodzeniu (młode z pokolenia F_1, których nie dobrano do kohort).

Parametry plemników

56. Parametry plemników należy mierzyć u wszystkich samców z pokolenia P, chyba że istnieją dane wykazujące, że parametry plemników nie uległy zmianom w trakcie 90-dniowego badania. Badanie parametrów plemników należy przeprowadzić u wszystkich samców z kohorty 1A.

57. Na koniec badania rejestruje się masy jąder i najądrzy wszystkich samców z pokoleń P i F_1 (z kohorty 1A). Zachowuje się przynajmniej jedno jądro i jedno najądrze do badania histopatologicznego. Pozostałe najądrza wykorzystuje się do oznaczenia liczby zapasów plemników w ogonie najądrzy (16)(17). Ponadto pobiera się plemniki z ogona najądrzy (lub nasieniowodu) za pomocą metod, które minimalizują szkody w odniesieniu do oceny ruchliwości plemników i ich morfologii (18).

58. Ruchliwość plemników można oceniać natychmiast po uśmierceniu albo można ją zarejestrować do dalszej analizy. Udział procentowy poruszających się postępowo plemników powinien zostać oceniony subiektywnie albo obiektywnie za pomocą wspomaganej komputerowo analizy ruchu (19)(20)(21)(22)(23)(24). Do celów oceny morfologii plemników należy zbadać próbkę plemników pochodzących z najądrza (lub nasieniowodu) w formie utrwalonych lub mokrych preparatów (25) i co najmniej 200 plemników na próbkę należy sklasyfikować jako prawidłowe (zarówno główka, jak i wstawka/część główna wici wydają się prawidłowe) lub nieprawidłowe. Przykłady nieprawidłowości morfologicznych plemników obejmują zrośnięcie, oddzielone główki i zniekształcone główki lub wici (26). Zniekształcone lub duże główki plemników mogą wskazywać na nieprawidłowości w spermiacji.

59. Jeżeli próbki plemników zostały zamrożone, wymazy utrwalone, a obrazy na potrzeby analizy ruchliwości plemników zarejestrowane w trakcie sekcji (27), późniejsze analizy można ograniczyć do grupy kontrolnej i samców otrzymujących wysoką dawkę. Jeżeli jednak odnotowuje się skutki związane z podawaniem, należy ocenić również grupy otrzymujące niższe dawki.

▼M5

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

60. W momencie uśmiercenia lub przedwczesnej śmierci wszystkie zwierzęta z pokoleń P i F_1 poddaje się sekcji i badaniu makroskopowemu pod kątem jakichkolwiek nieprawidłowości strukturalnych lub zmian patologicznych. Szczególną uwagę należy zwrócić na organy układu rozrodczego. Młode, które uśmiercono w sposób humanitarny, gdy były w stanie agonalnym, i martwe młode należy zarejestrować oraz, jeżeli nie zostały zmacerowane, zbadać je pod kątem możliwych wad lub przyczyny śmierci, a następnie zachować.

61. W dniu przeprowadzania sekcji bada się wymazy z pochwy pochodzące od dorosłych samic z pokoleń P i F_1 w celu określenia stadium cyklu estrogenowego i umożliwienia korelacji z histopatologią narządów rozrodczych. Macice wszystkich samic z pokolenia P (i samic z pokolenia F_1 w stosownych przypadkach) bada się na obecność i liczbę zagnieżdżonych płodów w sposób, który nie zaburza oceny histopatologicznej.

Masa narządów i konserwacja tkanek — dorosłe zwierzęta z pokolenia P i F_1

62. W momencie uśmiercenia określa się masy ciała i mokre masy narządów wymienionych poniżej pochodzące od wszystkich zwierząt z pokolenia P i od wszystkich dorosłych z pokolenia F_1 z odpowiednich kohort (jak określono poniżej) możliwie najszybciej po sekcji, aby uniknąć wysuszenia. Następnie należy zakonserwować te narządy w odpowiednich warunkach. O ile nie określono inaczej, narządy parzyste należy ważyć oddzielnie lub razem zgodnie z typową praktyką stosowaną przez dane laboratorium:

— macica (razem z jajowodami i szyjką macicy), jajniki,

— jądra, najądrza (całe i ogon najądrzy w przypadku próbek stosowanych do liczenia plemników),

— gruczoł krokowy (połączone części grzbietowo-boczne i brzuszne). Odcinając gruczoł krokowy, należy zachować ostrożność, aby uniknąć przebicia pęcherzyków nasiennych wypełnionych płynem. W przypadku wpływu podawania substancji na całkowitą masę gruczołu krokowego należy ostrożnie przeprowadzić sekcję segmentów grzbietowo-bocznych i brzusznych po utrwaleniu i zważyć je oddzielnie,

— pęcherzyki nasienne z gruczołami koagulującymi i ich płynami (jako całość),

— mózg, wątroba, nerki, serce, śledziona, grasica, przysadka, tarczyca (po utrwaleniu), nadnercze i znane narządy docelowe lub tkanki.

63. Oprócz wymienionych powyżej narządów należy zakonserwować w odpowiednich warunkach próbki nerwów obwodowych, mięśni, rdzenia kręgowego, oka i nerwu wzrokowego, przewodu pokarmowego, pęcherza moczowego, płuca, tchawicy (wraz z dołączonymi tarczycą i przytarczycami), szpiku kostnego, nasieniowodu (samce), gruczołu mlekowego (samce i samice) i pochwy.

64. Wszystkie narządy zwierząt z kohorty 1A są ważone i konserwowane na potrzeby histopatologii.

65. W celu zbadania powstałych przedurodzeniowych i pourodzeniowych skutków immunotoksycznych 10 samców i 10 samic spośród zwierząt z kohorty 1A z każdej grupy badanej (1 samiec lub 1 samica na miot; wszystkie mioty są reprezentowane przez co najmniej 1 młode; dobór losowy) będą objęte następującymi procedurami na koniec badania:

— ważenie węzłów chłonnych związanych i niezwiązanych z drogą narażenia (oprócz ważenia nadnerczy, grasicy i śledziony już przeprowadzonego u wszystkich zwierząt z kohorty 1A),

▼M5

— analiza subpopulacji limfocytów śledziony (CD4+ oraz CD8+ limfocytów T, limfocytów B oraz i komórek NK) przy wykorzystaniu połowy śledziony, a druga połowa jest konserwowana w celu oceny histopatologicznej.

Analiza subpopulacji limfocytów śledziony u zwierząt nieuodpornionych (z kohorty 1A) pozwoli ustalić, czy narażenie jest związane z przesunięciem w immunologicznej dystrybucji w stanie równowagi grasicozależnych limfocytów pomocniczych (CD4+) lub cytotoksycznych (CD8+) lub komórek NK (szybka reakcja na komórki nowotworowe i patogeny).

66. U zwierząt z kohorty 1B należy zważyć następujące narządy, a odpowiadające im tkanki przetworzyć na bloczek:

— pochwę (niezważoną),

— macicę z szyjką,

— jajniki,

— jądra (co najmniej jedno),

— najądrza,

— pęcherzyki nasienne z gruczołami koagulującymi,

— gruczoł krokowy,

— przysadkę,

— zidentyfikowane narządy docelowe.

Histopatologii kohorty 1B dokonuje się, jeżeli wyniki badań przeprowadzonych na osobnikach z kohorty 1A są niejednoznaczne lub w przypadkach, gdy podejrzewa się występowanie substancji zaburzających funkcjonowanie układu rozrodczego lub hormonalnego.

67. Kohorty 2A i 2B: badanie neurotoksyczności rozwojowej (dzień 21 lub 22 po urodzeniu i dorosłe potomstwo). Zwierzęta z kohorty 2A są uśmiercane po przeprowadzeniu badań behawioralnych, przy czym rejestruje się masę mózgu i przeprowadza pełną neurohistopatologię do celów oceny neurotoksyczności. Zwierzęta z kohorty 2B są uśmiercane w dniu 21 lub 22 po urodzeniu, przy czym rejestruje się masę ich mózgu i przeprowadza badanie mikroskopowe mózgu do celów oceny neurotoksyczności. Utrwalenie perfuzyjne jest wymagane w odniesieniu do zwierząt z kohorty 2A i opcjonalne w odniesieniu do zwierząt z kohorty 2B, jak określono w metodzie badawczej B.53 (35).

Masa narządów i konserwacja tkanek — odsadzone zwierzęta z pokolenia F_1

68. Młode niedobrane do kohort, w tym słabowite młode, są uśmiercane po odsadzeniu w dniu 22 po urodzeniu, chyba że wyniki wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych badań na żywych zwierzętach. Uśmiercone młode podlegają pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu, w tym ocenie narządów rozrodczych, jak opisano w pkt 62 i 63. Należy zważyć mózg, śledzionę i grasicę maksymalnie 10 młodych każdej płci z każdej grupy z możliwie największej liczby miotów oraz zachować je w odpowiednich warunkach. Ponadto można zakonserwować tkanki gruczołu mlekowego tych młodych samców i samic do celów dalszej analizy mikroskopowej ([1]) (zob. dokument zawierający wytyczne OECD nr 151 (40)). Należy zachować części wykazujące poważne nieprawidłowości oraz tkanki docelowe do możliwego badania histologicznego.

([1]) Badania wykazały, że gruczoł mlekowy, zwłaszcza na wczesnym stadium rozwoju, stanowi wrażliwy punkt końcowy działania estrogenów. Zaleca się, aby w opisywanej metodzie uwzględnić punkty końcowe obejmujące gruczoły mlekowe młodych obu płci przy walidacji.

▼M5

Histopatologia — zwierzęta z pokolenia P

69. Pełną histopatologię narządów wymienionych w pkt 62 i 63 przeprowadza się w odniesieniu do wszystkich zwierząt z pokolenia P otrzymujących wysoką dawkę i tworzących grupę kontrolną. Należy również zbadać narządy wykazujące zmiany związane z podawaniem substancji u wszystkich zwierząt z grup przyjmujących niższą dawkę, aby pomóc w wyznaczeniu poziomu NOAEL. Ponadto należy objąć oceną histopatologiczną narządy rozrodcze wszystkich zwierząt, u których podejrzewa się obniżoną płodność, np. tych, u których nie doszło do krycia, nie zostały zapłodnione, nie spłodziły albo nie urodziły zdrowego potomstwa lub w przypadku których cykliczność estrogenowa lub liczba, ruchliwość lub morfologia plemników uległy zmianom, jak również wszystkie poważne zmiany patologiczne.

Histopatologia — zwierzęta z pokolenia F_1

Zwierzęta z kohorty 1

70. Pełną histopatologię narządów wymienionych w pkt 62 i 63 przeprowadza się w odniesieniu do wszystkich dorosłych osobników z kohorty 1A otrzymujących wysoką dawkę i tych tworzących grupę kontrolną. Wszystkie mioty powinny być reprezentowane przez co najmniej jedno młode na płeć. Należy również zbadać narządy i tkanki wykazujące zmiany związane z podawaniem oraz wszystkie poważne zmiany patologiczne u wszystkich zwierząt z grup otrzymujących niższe dawki, aby pomóc w wyznaczeniu poziomu NOAEL. Do celów oceny powstałych przedurodzeniowych i pourodzeniowych skutków dla narządów limfoidalnych oprócz oceny histopatologicznej grasicy, śledziony i nadnerczy, która została już przeprowadzona u wszystkich zwierząt z kohorty 1A, należy także przeprowadzić ocenę histopatologiczną pobranych węzłów chłonnych i szpiku kostnego od 10 samców i 10 samic z kohorty 1A.

71. Tkanki układu rozrodczego i hormonalnego od wszystkich zwierząt z kohorty 1B przetworzone na bloczek, jak opisano w pkt 66, należy zbadać do celów histopatologii w przypadku, gdy podejrzewa się występowanie substancji zaburzających funkcjonowanie układu rozrodczego lub hormonalnego. Zwierzęta z kohorty 1B także powinny zostać poddane badaniu histologicznemu, jeżeli wyniki tego badania przeprowadzonego na zwierzętach z kohorty 1A są niejednoznaczne.

72. Jajniki dorosłych samic powinny zawierać pęcherzyki jajnikowe pierwotne i wzrastające oraz ciałka żółte; w związku z tym badanie histopatologiczne powinno mieć na celu sporządzenie oceny ilościowej pęcherzyków jajnikowych pierwotnych i małych pęcherzyków jajnikowych wzrastających oraz ciałek żółtych u samic z pokolenia F_1; liczba zwierząt, wybór wycinka jajnika oraz wielkość próbki wycinka powinny być statystycznie odpowiednie do zastosowanej procedury oceny. Oznaczenie liczby pęcherzyków można najpierw przeprowadzić na zwierzętach z grupy kontrolnej i grupy otrzymującej wysoką dawkę, a w przypadku wykrycia niepożądanych skutków w tej drugiej grupie należy zbadać zwierzęta z grupy otrzymującej niższe dawki. Badanie powinno obejmować oznaczenie liczby pęcherzyków jajnikowych pierwotnych, które można łączyć z małymi pęcherzykami wzrastającymi, w celu porównania jajników zwierząt z grupy badanej i zwierząt z grupy kontrolnej (zob. dokument zawierający wytyczne OECD nr 151 (40)). Ocenę ciałek żółtych należy przeprowadzać równolegle z badaniem cykliczności estrogenowej, tak aby w ocenie można było uwzględnić fazę cyklu. Jajowód, macicę i pochwę bada się pod kątem odpowiedniego rozwoju dla danego narządu.

73. Na samcach z pokolenia F_1 przeprowadza się szczegółowe badania histopatologiczne jąder w celu zidentyfikowania wpływu podawania substancji na różnicowanie się i rozwój jąder oraz na spermatogenezę (38). W miarę możliwości należy zbadać wycinki sieci jądra. Głowę, trzon i ogon najądrzy oraz nasieniowody bada się pod kątem odpowiedniego rozwoju dla danego narządu oraz pod kątem parametrów wymaganych w odniesieniu do samców z pokolenia P.

▼M5

Zwierzęta z kohorty 2

74. Neurohistopatologię przeprowadza się według płci u wszystkich zwierząt z kohorty 2A należących do grupy otrzymującej wysoką dawkę oraz do grupy kontrolnej po zakończeniu badania neurobehawioralnego (po dniu 75 po urodzeniu, ale nie później niż w dniu 90 po urodzeniu). Histopatologię mózgu wykonuje się według płci u wszystkich zwierząt z kohorty 2B należących do grupy otrzymującej wysoką dawkę oraz do grupy kontrolnej w dniu 21 lub 22 po urodzeniu. Należy również zbadać narządy lub tkanki, które wykazują zmiany związane z podawaniem, u zwierząt z grup przyjmujących niższą dawkę, aby pomóc w wyznaczeniu poziomu NOAEL. W przypadku zwierząt z kohorty 2A i 2B przeprowadza się badanie licznych wycinków z mózgu, aby umożliwić zbadanie opuszków węchowych, kory mózgu, hipokampu, jądra podstawnego, wzgórza, podwzgórza, śródmózgowia (pokrywy śródmózgowia, nakrywki śródmózgowia i konarów mózgu), pnia mózgu i móżdżka. Tylko u zwierząt z kohorty 2A bada się oczy (siatkówkę i nerw wzrokowy) oraz próbki nerwu obwodowego, mięśni i rdzenia kręgowego. Wszystkie procedury neurohistologiczne powinny być spójne z metodą badawczą B.53 (35).

75. Oceny morfometryczne (ilościowe) należy przeprowadzać na reprezentatywnych obszarach mózgu (wycinki homologiczne starannie dobrane na podstawie wiarygodnych mikroskopowych punktów orientacyjnych) i mogą one obejmować pomiary liniowe lub powierzchniowe określonych obszarów mózgu. Należy pobrać co najmniej trzy kolejne wycinki z każdego punktu orientacyjnego (poziomu) w celu dobrania najbardziej homologicznego i reprezentatywnego dla określonego obszaru mózgu wycinka na potrzeby oceny. Neuropatolog powinien stwierdzić, czy wycinki przygotowane do pomiaru są homologiczne z innymi w zbiorze stanowiącym próbkę i w związku z tym odpowiednie do włączenia, ponieważ w szczególności pomiary liniowe mogą się zmieniać na stosunkowo niewielkim dystansie (28). Nie należy używać wycinków niehomologicznych. Chociaż celem jest pobranie próbki od wszystkich zwierząt zarezerwowanych do tego celu (10/płeć/dawkę), mniejsza liczebność również może być odpowiednia. Próbki pobrane od mniej niż 6 zwierząt/płeć/dawkę z reguły nie będą jednak uznawane za wystarczające do celów opisywanej metody badawczej. Można zastosować stereologię w celu zidentyfikowania wpływu podawanej substancji na takie parametry jak objętość lub liczba komórek w odniesieniu do określonych obszarów neuroanatomicznych. Na wszystkich etapach preparowania próbek tkanek, począwszy od utrwalania tkanek przez sekcję próbek tkanek, przetwarzanie tkanki i barwienie preparatów, należy stosować zrównoważony schemat, tak aby każda seria zwierała reprezentatywne próbki z każdej grupy dawkowania. Jeżeli ma zostać przeprowadzona analiza morfometryczna lub stereologiczna, tkankę mózgową należy zanurzyć w odpowiednim roztworze w odniesieniu do wszystkich poziomów dawkowania w tym samym czasie w celu uniknięcia zmniejszania się artefaktów, co może być związane z przedłużonym przetrzymywaniem w utrwalaczu.

SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

76. Dane dostarcza się oddzielnie i w podstaci podsumowania w formie zestawień tabelarycznych. W stosownych przypadkach w odniesieniu do każdej grupy badanej i każdego pokolenia należy przedstawić następujące dane: liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które padły podczas badania lub które uśmiercono z przyczyn humanitarnych, czas śmierci lub uśmiercenia z przyczyn humanitarnych, liczbę płodnych zwierząt, liczbę ciężarnych samic, liczbę samic, które urodziły miot, oraz liczbę zwierząt, które wykazują oznaki toksyczności. Należy również dostarczyć opis toksyczności, w tym dzień wystąpienia, okres trwania i dotkliwość.

77. Wyniki numeryczne powinny zostać oszacowane z zastosowaniem właściwej i zatwierdzonej metody statystycznej. Metody statystyczne powinny zostać wybrane jako część projektu badania i powinny odpowiednio uwzględniać dane nienormalne (np. dane o liczbie), dane cenzurowane (np. ograniczony czas obserwacji), zależność (np. wpływ na miot i powtarzane pomiary) oraz nierówne wariancje. Uogólnione mieszane

▼M5

modele liniowe i modele oparte na zależności dawka-odpowiedź obejmują szeroki wybór narzędzi analitycznych, które mogą być odpowiednie dla danych uzyskanych w ramach omawianej metody badawczej. Sprawozdanie powinno zawierać wystarczające informacje na temat metody analizy i zastosowanego programu komputerowego, tak aby niezależny recenzent/statystyk mógł dokonać oceny/powtórnej oceny analizy.

Ocena wyników

78. Wyniki należy ocenić w odniesieniu do obserwowanych skutków, w tym wyników sekcji i badań mikroskopowych. Ocena obejmuje zależność lub brak zależności między dawką a obecnością, częstością występowania i dotkliwością nieprawidłowości, w tym poważnych zmian patologicznych. Należy również ocenić narządy docelowe, płodność, nieprawidłowości kliniczne, zmienione funkcje rozrodcze i wyniki w odniesieniu do miotów, zmiany masy ciała, śmiertelność i wszelkie inne skutki toksyczne i rozwojowe. Szczególną uwagę należy zwrócić na zmiany zależne od płci. Przy ocenie wyników badań należy uwzględnić właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej oraz, jeżeli są dostępne, dane toksykokinetyczne, w tym przenikanie przez łożysko i wydzielanie do mleka.

Sprawozdanie z badania

79. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje uzyskane w ramach niniejszego badania prowadzonego na zwierzętach z pokoleń P, F_1 oraz F_2 (w stosownych przypadkach):

Badana substancja chemiczna:

— wszystkie dostępne istotne informacje na temat substancji chemicznej, właściwości toksykokinetycznych i toksykodynamicznych badanej substancji chemicznej,

— dane identyfikacyjne,

— czystość.

Nośnik (w stosownych przypadkach):

— uzasadnienie wyboru nośnika, jeżeli jest inny niż woda.

Badane zwierzęta:

— wykorzystany gatunek/szczep,

— liczba zwierząt, ich wiek i ich płeć,

— źródło pochodzenia, warunki trzymania, pasza, materiały do budowy gniazda itp.,

— masa ciała każdego zwierzęcia na początku badania,

— dane dotyczące wymazu z pochwy w odniesieniu do samic z pokolenia P przed rozpoczęciem podawania (jeżeli dane zgromadzono w tym czasie),

— dane dotyczące kojarzenia u pokolenia P, wskazujące na samca i samicę, których wybrano do krycia, oraz czy doszło do krycia,

— dane dotyczące miotu pochodzenia w odniesieniu do dorosłych zwierząt z pokolenia F_1.

Warunki badania:

— uzasadnienie wyboru poziomu dawki,

— szczegóły dotyczące przygotowania formy użytkowej badanej substancji chemicznej/przygotowania paszy, uzyskanych stężeń,

▼M5

— trwałość i jednorodność preparatu w nośniku lub substancji nośnikowej (np. paszy, wody pitnej), w krwi lub mleku w warunkach użytkowania i przechowywania między poszczególnymi dawkowaniami,

— szczegóły dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,

— w stosownych przypadkach przeliczenie stężeń (ppm) badanej substancji chemicznej w paszy/wodzie pitnej na uzyskaną dawkę (mg/kg masy ciała/dobę),

— szczegóły dotyczące jakości pokarmu i wody (w tym składników paszy, jeżeli dostępne),

— szczegółowy opis procedur randomizacji stosowanych do doboru młodych do eliminacji i przydzielania młodych do grup badanych,

— warunki środowiskowe,

— wykaz personelu badawczego, w tym odbyte szkolenia zawodowe.

Wyniki (podsumowanie wszystkich danych i dane indywidualne według płci i dawki):

— spożycie pokarmu, spożycie wody, jeżeli odnośne dane są dostępne, wydajność pokarmu (przyrost masy ciała na gram spożywanego pokarmu, z wyjątkiem okresów wspólnego przebywania w klatce i laktacji) oraz spożycie badanej substancji chemicznej (w przypadku podawania z paszą/woda pitną) w odniesieniu do zwierząt z pokoleń P i F_1,

— dane dotyczące wchłaniania (jeżeli są dostępne),

— dane dotyczące masy ciała zwierząt z pokolenia P,

— dane dotyczące masy ciała wybranych zwierząt z pokolenia F_1 w okresie po odsadzeniu,

— czas śmierci, jeżeli zwierzę padło w trakcie badania, lub informacja, że zwierzęta przeżyły do uśmiercenia,

— charakter, dotkliwość i czas trwania obserwacji klinicznych (odwracalne czy nie),

— dane pochodzące z hematologii, badania moczu i chemii klinicznej, w tym dotyczące TSH i T4,

— analiza fenotypowa limfocytów śledziony (limfocytów T, limfocytów B i komórek NK),

— komórkowość szpiku kostnego,

— dane dotyczące reakcji na toksyczność,

— liczba samic z pokoleń P i F_1, u których występuje normalny lub nienormalny cykl estrogenowy i czas trwania cyklu,

— czas do krycia (odstęp przed kopulacją, liczba dni między kojarzeniem a kryciem),

— skutki toksyczne lub inne dla rozrodczości, w tym liczba i odsetek zwierząt, które przeszły przez krycie, ciążę, poród i laktację, liczba i odsetek samców, które zapłodniły samice, oraz samic z objawami dystocji/długotrwałego lub trudnego porodu,

— czas trwania ciąży oraz, jeżeli odnośne dane są dostępne, porodu,

— liczba zagnieżdżeń, liczebność miotu i odsetek samców wśród młodych,

— liczba i odsetek strat pozagnieżdżeniowych, żywych urodzeń i martwych urodzeń,

▼M5

— dane dotyczące masy miotu i masy młodych (samców, samic i łącznie), liczba słabowitych młodych, jeżeli ją określono,

— liczba młodych z wyraźnie widocznymi nieprawidłowościami,

— skutki toksyczne lub inne dla potomstwa, rozwoju pourodzeniowego, żywotności itp.,

— dane dotyczące fizycznych punktów orientacyjnych u młodych i inne dane dotyczące rozwoju pourodzeniowego,

— dane dotyczące dojrzewania płciowego zwierząt z pokolenia F_1,

— w stosownych przypadkach dane dotyczące obserwacji funkcjonalnych młodych i dorosłych,

— dane dotyczące masy ciała w momencie uśmiercania oraz bezwzględnej i względnej masy narządu w odniesieniu do zwierząt z pokolenia P i dorosłych z pokolenia F_1,

— wyniki sekcji,

— szczegółowy opis wszystkich wyników histopatologicznych,

— całkowita liczba plemników w ogonie najądrza, odsetek poruszających się postępowo plemników, odsetek morfologicznie normalnych plemników oraz odsetek plemników z każdą określoną nieprawidłowością w odniesieniu do samców z pokoleń P i F_1,

— w stosownych przypadkach liczba i stadia dojrzewania pęcherzyków jajnikowych znajdujących się w jajnikach samic z pokoleń P i F_1,

— oznaczenie liczby ciałek żółtych w jajnikach samic z pokolenia F_1,

— w stosownych przypadkach statystyczne opracowanie wyników.

Parametry kohorty 2:

— szczegółowy opis procedur stosowanych do standaryzacji obserwacji i procedur oraz definicji operacyjnych do celów punktowego oceniania obserwacji,

— wykaz wszystkich zastosowanych procedur badawczych i uzasadnienie ich zastosowania,

— szczegóły dotyczące zastosowanych procedur behawioralnych/funkcjonalnych, neuropatologicznych i morfometrycznych, w tym informacje i szczegóły dotyczące urządzeń automatycznych,

— procedury kalibracji i zapewniania równoważności urządzeń oraz bilansowanie grup badanych w procedurach badawczych,

— krótkie uzasadnienie wyjaśniające wszelkie decyzje wiążące się z opinią eksperta,

— szczegółowy opis wszystkich wyników behawioralnych/funkcjonalnych, neuropatologicznych i morfometrycznych według płci i grupy dawkowania, w tym wzrosty i spadki w porównaniu do grupy kontrolnej,

— masa mózgu,

— wszelkie diagnozy postawione na podstawie objawów neurologicznych i zmian patologicznych, w tym pojawiające się w sposób naturalny choroby lub schorzenia,

— obrazy przykładowych wyników badań,

— obrazy z urządzeń o małej mocy do oceny homologii wycinków zastosowanych do celów morfometrii,

▼M5

— statystyczne opracowanie wyników, w tym modele statystyczne zastosowane w celu analizy danych i wyników, niezależnie od tego, czy były one istotne,

— związek wszelkich innych skutków toksycznych z wnioskiem dotyczącym potencjału neurotoksycznego badanej substancji chemicznej według płci i grupy dawkowania,

— wpływ wszelkich informacji toksykokinetycznych na wnioski,

— dane potwierdzające wiarygodność i czułość metody badawczej (tj. dane dotyczące dodatnich i historycznych kontroli),

— związki, jeżeli występują, między skutkami neuropatologicznymi a czynnościowymi,

— NOAEL lub dawka wyznaczająca w odniesieniu do matek i potomstwa według płci i grupy dawkowania,

— dyskusja na temat ogólnej interpretacji danych na podstawie wyników, w tym wniosek dotyczący tego, czy substancja chemiczna spowodowała neurotoksyczność rozwojową i NOAEL.

Parametry kohorty 3:

— miana przeciwciał IgM w surowicy (sensytyzacja na SRBC lub KLH) lub jednostki komórek tworzących łysinki w śledzionie (sensytyzacja na SRBC),

— działanie metody reakcji przeciwciał zależnej od limfocytów T powinno zostać potwierdzone w ramach procesu optymalizacji przez laboratorium, które wykonuje test po raz pierwszy, a następnie powinno być potwierdzane okresowo przez wszystkie laboratoria (np. corocznie),

— omówienie ogólnej interpretacji danych na podstawie wyników, w tym wniosek dotyczący tego, czy substancja chemiczna spowodowała immunotoksyczność rozwojową i NOAEL.

Omówienie wyników

Wnioski, w tym wartości NOAEL w odniesieniu do skutków dla rodziców i potomstwa

Należy również przekazać wszystkie informacje, których nie uzyskano w trakcie badania, a które są przydatne do celów interpretacji wyników (np. podobieństwa skutków do tych wywoływanych przez jakiekolwiek znane środki neurotoksyczne).

Interpretacja wyników

80. Rozszerzone badanie toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia dostarczy informacji na temat wpływu powtarzanego narażenia na substancję chemiczną podczas wszystkich faz cyklu rozrodczego, w zależności od potrzeb. W szczególności badanie dostarczy informacji na temat układu rozrodczego oraz rozwoju, wzrostu, przeżycia i funkcjonalnych punktów końcowych w odniesieniu do potomstwa w wieku do 90 dnia po urodzeniu.

81. W interpretacji wyników badania należy uwzględniać wszystkie dostępne informacje dotyczące substancji chemicznej, w tym właściwości fizykochemiczne, toksykokinetyczne i toksykodynamiczne, dostępne odpowiednie informacje na temat analogów strukturalnych oraz wyniki przeprowadzonych wcześniej badań toksyczności z użyciem badanej substancji chemicznej (np. ostra toksyczność, toksyczność po powtarzanym podawaniu, badania mechanistyczne i badania oceniające, czy występują istotne różnice jakościowe i ilościowe między gatunkami pod względem właściwości metabolicznych *in vivo*/*in vitro*). Pełne rozpoznanie histopatologiczne i wyniki pomiarów masy narządów należy oceniać w kontekście obserwacji poczynionych podczas innych badań powtarzanego dawkowania, jeżeli jest to wykonalne. Można uznać, że obniżony wzrost potomstwa ma związek z wpływem badanej substancji chemicznej na skład mleka (29).

▼M5

Kohorta 2 (neurotoksyczność rozwojowa)

82. Wyniki neurobehawioralne i neuropatologiczne należy interpretować w kontekście wszystkich ustaleń, stosując podejście wagi dowodów i wiedzę specjalistyczną. Należy omówić wzory wyników badań behawioralnych lub morfologicznych, jeżeli występują, oraz dowody zależności dawka-odpowiedź. W tej charakterystyce należy zawrzeć ocenę neurotoksyczności rozwojowej, w tym badania epidemiologiczne u ludzi lub studia przypadków, i badania na zwierzętach doświadczalnych (np. dane toksykokinetyczne, informacje dotyczące związku między strukturą a działaniem, dane z innych badań toksyczności). Ocena danych powinna obejmować omówienie istotności biologicznej i statystycznej. Ocena powinna obejmować związek, jeżeli taki występuje, między obserwowanymi zmianami neuropatologicznymi i behawioralnymi. W odniesieniu do wytycznych dotyczących interpretowania wyników neurotoksyczności rozwojowej należy zapoznać się z metodą badawczą B.53 (35) oraz publikacją Tyl i in., 2008 (31).

Kohorta 3 (immunotoksyczność rozwojowa)

83. Supresję lub wzmocnienie funkcji układu odpornościowego stwierdzone w reakcji przeciwciał zależnej od limfocytów T należy oceniać w kontekście wszystkich poczynionych obserwacji. Znaczenie wyników reakcji przeciwciał zależnej od limfocytów T mogą potwierdzać inne oddziaływania na wskaźniki związane z odpornością (np. komórkowość szpiku kostnego, masa i histopatologia tkanek limfoidalnych, rozkład podzbioru limfocytów). Skutki ustalone w ramach reakcji przeciwciał zależnej od limfocytów T mogą mieć mniejsze znaczenie w przypadku innych toksyczności obserwowanych przy niższym stężeniu narażenia.

84. Przy interpretowaniu wyników dotyczących rozrodczości i neurotoksyczności pomocny może być dokument zawierający wytyczne OECD nr 43 (26).

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., Walls, I. (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Waszyngton DC.

(4) 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.

(5) 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.

(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*, część 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*, część B, 80 (2), 84–97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', [w:] C.R. Auston and R.V. Short (red.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, Nowy Jork.

(12) 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.

(13) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (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, Część A*, Academic, Orlando, Floryda. s. 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, Paryż.

(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, Paryż.

(33) Rozdział B.43 niniejszego załącznika: ‘Badanie neurotoksyczności u gryzoni’.

(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, Paryż.

(35) Rozdział B.53 niniejszego załącznika: ‘Badanie neurotoksyczności rozwojowej’.

(36) Rozdział B.54 niniejszego załącznika: ‘Test biologiczny wzrostu macicy u gryzoni: krótkoterminowe badanie przesiewowe właściwości estrogennych’.

(37) Rozdział B.55 niniejszego załącznika: ‘Test biologiczny Hershbergera na szczurach: krótkoterminowe badanie przesiewowe właściwości (anty)androgennych’.

▼**M5**

(38) OECD (2009), *Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents*, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paryż.

(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, Paryż.

(40) OECD (2013), *Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paryż.

▼**M5**

Dodatek 1

Pomiary i obserwacje uwzględnione w zestawie badań funkcjonalno-obserwacyjnych (kohorta 2A)

Klatka macierzysta i otwarta przestrzeń	Manipulacyjne	Fizjologiczne
Postawa	Łatwość usuwania	Temperatura
Mimowolne ruchy kloniczne i toniczne	Łatwość obchodzenia się	Masa ciała
Zamknięcie powiek	Tonus	Reakcja źrenicy
Piloerksja	Reakcja na podejście	Rozmiar źrenicy
Ślinienie	Reakcja na dotyk	
Łzawienie	Reakcja słuchowa	
Wydawanie odgłosów	Reakcja na szczypanie ogona	
Stawanie na tylnych kończynach	Reakcja przyjmowania prawidłowej postawy	
Nieprawidłowości w chodzie	Odległość między kończynami tylnymi przy lądowaniu	
Pobudzenie	Siła uchwytu kończyn przednich	
Stereotypia	Siła uchwytu kończyn tylnych	
Dziwne zachowania		
Plamy		
Nieprawidłowości w oddychaniu		

▼**M5**

Dodatek 2

DEFINICJE:

Substancja chemiczna: oznacza substancję lub mieszaninę.

Badana substancja chemiczna: oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

▼M5

B.57. **TEST STEROIDOGENEZY H295R**

WPROWADZENIE

1. Opisywana metoda badawcza jest zgodna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 456 (2011 r.). W 1998 r. OECD podjęła działania o wysokim priorytecie, mające na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych na potrzeby badań przesiewowych i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Ramy koncepcyjne OECD z 2002 r. w zakresie badań i oceny substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) obejmują pięć poziomów, z których każdy odpowiada innemu poziomowi złożoności biologicznej (1). W opisanym w niniejszej metodzie badawczej teście steroidogenezy H295R *in vitro* (H295R) wykorzystuje się linię ludzkich komórek raka nadnercza (komórki NCI-H295R) i stanowi on „test *in vitro* pozwalający na uzyskanie danych mechanistycznych" poziomu 2, do celów badań przesiewowych i ustalania substancji priorytetowych. Opracowanie i standaryzacja powyższego testu jako badania przesiewowego chemicznego wpływu na steroidogenezę, w szczególności na produkcję 17β-estradiolu (E2) i testosteronu (T), odbywały się w wielu etapach. Test H295R był optymalizowany i poddawany walidacji (2)(3)(4)(5).

2. Test steroidogenezy H295R ma na celu wykrywanie substancji chemicznych, które mają wpływ na produkcję E2 i T. Test H295R ma identyfikować ksenobiotyki, których działanie ukierunkowane jest na składniki endogenne składające się na międzykomórkowy szlak biochemiczny rozpoczynający się sekwencją reakcji od cholesterolu po produkcję E2 lub T. Test H295R nie ma na celu identyfikacji substancji chemicznych, które wpływają na steroidogenezę, z uwagi na jego oddziaływanie na oś podwzgórze–przysadka–gonady (HPG). Celem opisywanego testu jest uzyskanie odpowiedzi TAK/NIE w odniesieniu do zdolności danej substancji chemicznej do wywoływania lub hamowania produkcji T i E2; jednak w niektórych przypadkach można uzyskać wyniki ilościowe (zob. pkt 53 i 54). Wyniki testu wyraża się jako względne zmiany w produkcji hormonów w porównaniu z kontrolą rozpuszczalnika (KR). Celem tego testu nie jest dostarczenie określonych informacji mechanistycznych dotyczących interakcji badanej substancji chemicznej z układem hormonalnym. Aby zidentyfikować wpływ na określone enzymy i hormony pośrednie, takie jak progesteron, przeprowadzono badania z wykorzystaniem danej linii komórkowej (2).

3. Definicje i skróty stosowane w opisywanej metodzie badawczej są opisane w dodatku. Szczegółowy protokół zawierający wskazówki dotyczące sposobu przygotowywania roztworów, hodowania komórek i przeprowadzania różnych aspektów testu przedstawiono w dodatkach I–III do dokumentu OECD 'Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production' (Międzylaboratoryjna walidacja testu steroidogenezy H295R mająca na celu identyfikację modulatorów wytwarzania testosteronu i estradiolu) (4).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

4. W biosyntezie sześciu sterydowych hormonów płciowych udział bierze pięć różnych enzymów katalizujących sześć różnych reakcji. Enzymatyczna konwersja cholesterolu do pregnenolonu za pomocą enzymu rozszczepiającego łańcuch boczny cholesterolu (CYP11 A) z rodziny enzymów cytochromu P450 (CYP) stanowi początkowy etap serii reakcji biochemicznych, które prowadzą do syntezy sterydowych produktów końcowych. W zależności od kolejności następnych dwóch reakcji następuje podział szlaku steroidogenezy na dwa szlaki, szlak Δ^5-hydroksysteroidowy i szlak Δ^4-ketosteroidowy, które łączą się w produkcji androstenedionu (rys. 1).

5. Konwersja androstenedionu do testosteronu (T) zachodzi za pomocą dehydrogenazy 17β-hydroksysteroidowej (17β-HSD). Testosteron jest zarówno hormonem pośrednim, jak i produktem końcowym. U samców T można przekształcić w dihydrotestosteron (DHT) w wyniku działania 5-α-red.uktazy, która znajduje się w błonach komórkowych, otoczce jądrowej i siateczce śródplazmatycznej tkanek, na które ukierunkowane jest działanie androgenów, takich jak prostata i pęcherzyki nasienne. DHT jest znacznie silniejszy jako androgen niż T i jest również uważany za hormon końcowy. W teście H295R nie mierzy się poziomu dihydrotestosteronu (zob. pkt 10).

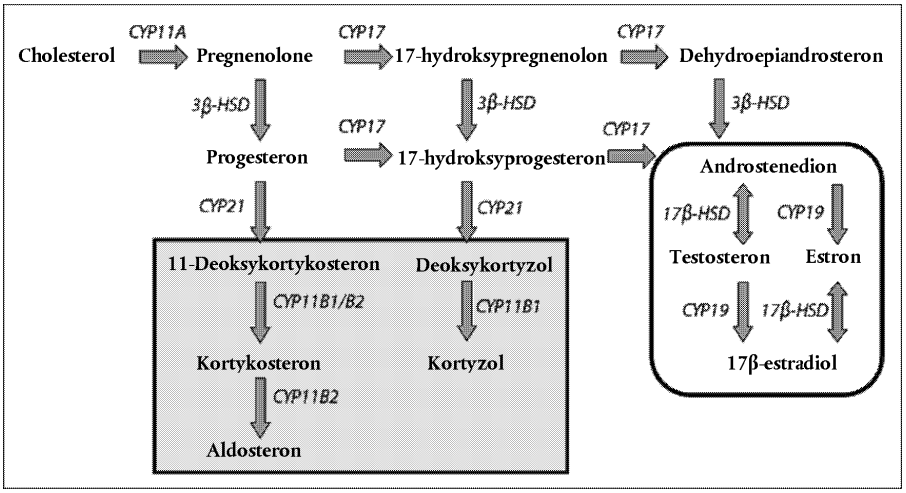
▼M5

6. Enzymem w przebiegu steroidogenezy, który umożliwia konwersję androgenowych substancji chemicznych w estrogenowe substancje chemiczne jest aromataza (CYP19). Aromataza przekształca testosteron (T) w 17β-estradiol (E2), a androstenedion w estron. E2 i T uważa się za końcowe hormony szlaku steroidogenezy.

7. Specyfika działania liazów CYP17 różni się w odniesieniu do substratów pośrednich między gatunkami. U ludzi enzym ten faworyzuje substraty szlaku Δ^5-hydroksysteroidowego (pregnenolon), natomiast u szczurów faworyzowane są substraty w szlaku Δ^4-ketosteroidowym (progesteron) (19). Takie różnice w działaniu liazów CYP17 mogą wyjaśniać niektóre różnice w reakcji na substancje chemiczne między gatunkami, które skutkują zmianą steroidogenezy *in vivo* (6). Wykazano, że komórki H295 najwierniej odzwierciedlają ekspresję enzymów kory nadnerczy oraz schemat produkcji sterydów u ludzi dorosłych (20), ale znane są z ekspresji enzymów zarówno w szlaku Δ^5-hydroksysteroidowym, jak i w szlaku Δ^4-ketosteroidowym syntezy androgenu (7)(11)(13)(15).

Rysunek 1

Przebieg steroidogenezy w komórkach H295R



Uwaga:

Enzymy oznaczono kursywą, hormony oznaczono wytłuszczeniem, zaś strzałki wskazują kierunek syntezy. Szare tło wskazuje na szlaki/produkty kortykosterydowe. W okrągłej ramce umieszczono szlaki/produkty sterydowych hormonów płciowych. CYP = cytochrom P450; HSD = dehydrogenaza hydroksysteroidowa; DHEA = dehydroepiandrosteron.

8. Linia ludzkich komórek raka nadnercza H295R stanowi użyteczny model *in vitro* do celów badania wpływu na syntezę hormonów sterydowych (2)(7)(8)(9)(10). W linii komórek H295R zachodzi ekspresja genów kodujących dla wszystkich przedstawionych powyżej enzymów kluczowych dla steroidogenezy (11)(15) (rys. 1). Jest to unikalna właściwość, ponieważ ekspresja tych genów *in vivo* jest uzależniona od tkanek i stadium rozwojowego i zazwyczaj żadna pojedyncza tkanka ani pojedyncze stadium rozwojowe nie pozwala na ekspresję wszystkich genów biorących udział w steroidogenezie (2). Komórki H295R wykazują właściwości fizjologiczne strefowo niezróżnicowanych komórek nadnercza ludzkiego płodu (11). Komórki te stanowią wyjątkowy system *in vitro*, z uwagi na fakt, że posiadają one zdolność produkowania wszystkich hormonów sterydowych występujących w korze nadnerczy i gonadach u dorosłych ludzi, pozwalając na

▼M5

badanie wpływu na syntezę kortykosterydów i produkcję sterydowych hormonów płciowych, takich jak androgeny i estrogeny, mimo że test ten uzyskał walidację wyłącznie w odniesieniu do wykrywania T i E2. Zmiany zarejestrowane przez system testowy w postaci zmian w produkcji T i E2 mogą być wynikiem szeregu różnych interakcji badanych substancji chemicznych o funkcjach związanych ze steroidogenezą, które wyrażają komórki H295R. Mogą one obejmować modulację ekspresji, syntezy lub działania enzymów biorących udział w produkcji, transformacji lub eliminacji hormonów sterydowych (12)(13)(14). Zahamowanie produkcji hormonów może być wynikiem bezpośredniego konkurencyjnego wiązania z enzymem w szlaku, wpływu na współczynniki, takie jak NADPH (fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego) i cAMP (cykliczny adenozynomonofosforan) lub zwiększenia metabolizmu sterydów lub supresji ekspresji genów niektórych enzymów w szlaku steroidogenezy. Podczas gdy zahamowanie może być funkcją zarówno bezpośrednich, jak i pośrednich procesów składających się na produkcję hormonów, indukcja ma zazwyczaj charakter pośredni na przykład poprzez oddziaływanie na współczynniki takie jak NADPH i cAMP (podobnie jak w przypadku forskoliny), ograniczanie metabolizmu sterydów (13) i zwiększanie ekspresji genów steroidogenezy.

9. Test H295R ma liczne zalety:

— pozwala na wykrywanie zarówno zwiększenia, jak i zmniejszenia produkcji T i E2,

— umożliwia bezpośrednią ocenę potencjalnego wpływu substancji chemicznej na żywotność/cytotoksyczność komórek. Jest to istotna cecha, ponieważ pozwala na odróżnienie skutków będących wynikiem cytotoksyczności od skutków, które wynikają z bezpośredniej interakcji substancji chemicznych ze szlakami steroidogenezy, co nie jest możliwe w przypadku systemów eksplantów tkanek, które składają się z licznych rodzajów komórek charakteryzujących się różnymi czułościami i funkcjami,

— nie wymaga wykorzystywania zwierząt,

— linia komórek H295R jest dostępna na rynku.

10. Główne ograniczenia tego testu są następujące:

— zdolność metaboliczna testu nie jest znana, ale najprawdopodobniej jest dosyć ograniczona; w związku z tym substancje chemiczne, które wymagają aktywacji metabolicznej, zostaną prawdopodobnie pominięte w tym teście;,

— ponieważ komórki H295R uzyskuje się z tkanki nadnercza, zawierają one enzymy zdolne do produkowania gluko- i mineralokortykoidów oraz hormonów płciowych, w związku z czym oddziaływanie na produkcję gluko- i mineralokortykoidów może mieć wpływ na obserwowane w ramach tego testu poziomy T i E2,

— w teście tym nie dokonuje się pomiaru poziomu DHT i w związku z tym nie oczekuje się, że zostaną wykryte substancje chemiczne hamujące 5-α-reduktazę; w takim przypadku można zastosować test Hershbergera (16),

— w teście H295R nie zostaną wykryte substancje chemiczne zakłócające steroidogenezę poprzez oddziaływanie na oś podwzgórze–przysadka–gonady (HPG), ponieważ można to zbadać wyłącznie na zwierzętach nienaruszonych.

ZASADA BADANIA

11. Opisywany test ma na celu wykrywanie substancji chemicznych, które mają wpływ na produkcję T i E2. T jest również produktem pośrednim na szlaku prowadzącym do produkcji E2. W omawianym teście można wykryć substancje chemiczne, które zazwyczaj hamują lub wywołują działanie enzymów szlaku steroidogenezy.

▼M5

12. Omawiany test przeprowadza się zazwyczaj w normalnych warunkach kultury komórkowej na płytkach 24-dołkowych. Ewentualnie dopuszcza się stosowanie innych rozmiarów płytek do przeprowadzania testu; warunki posiewu i warunki doświadczalne należy odpowiednio dostosowywać, aby zachować zgodność z kryteriami wykonania testu.

13. Po zakończeniu 24-godzinnego okresu aklimatyzacji w płytkach wielodołkowych komórki poddaje 48-godzinnemu okresowi narażenia na siedem stężeń badanej substancji chemicznej co najmniej trzykrotnie. Rozpuszczalnik oraz znany inhibitor produkcji hormonów i czynnik wywołujący produkcję hormonów w stałym stężeniu stosuje się jako kontrole ujemną i dodatnią. Po zakończeniu okresu narażenia z każdego dołka usuwa się podłoże. Natychmiast po usunięciu podłoża bada się żywotność komórek w każdym dołku. Stężenia hormonów w podłożu można mierzyć, stosując szereg różnych metod, w tym za pomocą dostępnych na rynku zestawów do pomiaru hormonów lub technik instrumentalnych, takich jak chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią masową (LC-MS). Dane wyraża się jako krotność zmiany w stosunku do kontroli rozpuszczalnika i najniższego stężenia, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC). Jeżeli wynik testu jest ujemny, najwyższe zbadane stężenie rejestruje się jako najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC). Wnioski dotyczące zdolności substancji chemicznej do oddziaływania na steroidogenezę należy formułować na podstawie co najmniej dwóch niezależnych prób badawczych. Pierwsza próba badawcza może pełnić rolę próby służącej ustaleniu zakresu, po którym w razie potrzeby dostosowuje się stężenia dla prób 2 i 3, jeżeli wystąpią problemy związane z rozpuszczalnością lub cytotoksycznością lub jeżeli wydaje się, że aktywność danej substancji chemicznej znajduje się na poziomie granicznej wartości zakresu badanych stężeń.

PROCEDURA HODOWLI

Linia komórkowa

14. Komórki NCI-H295R są dostępne komercyjnie z amerykańskiego zbioru typów kultur (ATCC) po podpisaniu porozumienia o transferze materiału (MTA) ([1]).

Wprowadzenie

15. W związku ze zmianami zdolności komórek do produkcji E2 wraz z wiekiem i wzrostem liczby pasaży (2), komórki należy hodować zgodnie z określonym protokołem, zanim zostaną wykorzystane, i należy odnotować liczbę pasaży od momentu rozmrożenia komórek oraz numer pasażu, przy którym komórki zostały zamrożone i umieszone w zbiorniku z ciekłym azotem. Pierwsza wartość oznacza faktyczną liczbę pasaży komórek, podczas gdy druga wartość oznacza numer pasażu, przy którym komórki zostały zamrożone i umieszczone w zbiorniku. Przykładowo komórki, które zostały zamrożone po piątym pasażu i rozmrożone, a następnie trzykrotnie podzielone (4 pasaże, licząc świeżo rozmrożone komórki jako pasaż 1), po ponownym umieszczeniu w hodowli zostałyby oznaczone jako pasaż 4.5. Przykładowy schemat numerowania przedstawiono w dodatku I do sprawozdania z walidacji (4).

16. Podłoże wyjściowe stosuje się jako podstawę podłoża wzbogaconego i podłoża do zamrażania. Podłoże wzbogacone jest niezbędnym składnikiem do hodowli komórek. Podłoże do zamrażania jest specjalnie opracowane, aby umożliwić zamrażanie komórek bez skutków ubocznych do celów ich długoterminowego przechowywania. Przed zastosowaniem należy przeprowadzić analizę Nu-serum (lub porównywalnego serum o równoważnych właściwościach, w przypadku którego wykazano, że dostarcza danych spełniających wymogi w zakresie przeprowadzania testu i kontroli jakości), które jest składnikiem podłoża wzbogaconego, pod kątem wyjściowych stężeń T i E2. Sposób przygotowania tych roztworów opisano w dodatku II do sprawozdania z walidacji (4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

▼M5

17. Po zainicjowaniu kultury komórkowej H295R z oryginalnej partii ATCC komórki należy hodować przez pięć pasaży (tj. komórki dzieli się czterokrotnie). Komórki pasażu piątego są następnie zamrażane w ciekłym azocie do celów przechowywania. Przed zamrożeniem komórek dokonuje się analizy próbki komórek poprzedniego pasażu czwartego na płytce kontroli jakości (zob. pkt 36 i 37), aby zweryfikować, czy podstawowa produkcja hormonów i reakcja na substancje chemiczne kontroli dodatniej spełniają wymogi w zakresie kontroli jakości testu zgodnie z tabelą 5.

18. Komórki H295R należy hodować, zamrozić i przechowywać w ciekłym azocie, aby mieć pewność, że komórki z odpowiedniego pasażu/w odpowiednim wieku są zawsze dostępne do hodowli i użytku. Maksymalna liczba pasaży po wybraniu nowej ([1]) lub zamrożonej ([2]) partii komórek do kultury komórkowej, która jest dopuszczalna w przypadku testu H295R, nie powinna przekraczać 10. Przykładowo w przypadku kultur komórek pochodzących z partii zamrożonych przy pasażu 5 dopuszczalne byłyby pasaże z przedziału 4.5–10.5. W przypadku komórek uzyskanych z tych zamrożonych partii należy przestrzegać procedury opisanej w pkt 19. Komórki te należy hodować przez co najmniej cztery (4) dodatkowe pasaże (pasaż 4.5), zanim zostaną wykorzystane do testów.

Uzyskiwanie komórek z zamrożonego zapasu

19. Procedurę uzyskiwania komórek z zamrożonego zapasu należy stosować w przypadku, gdy nową partię komórek wyjmuje się z ciekłego azotu do celów hodowli i testów. Szczegóły dotyczące tej procedury przedstawiono w dodatku III do sprawozdania z walidacji (4). Komórki wyjmuje się z ciekłego azotu, natychmiast się je rozmraża, umieszcza w podłożu wzbogaconym w probówce wirówkowej, odwirowuje w temperaturze pokojowej, ponownie zawiesza w podłożu wzbogaconym, a następnie umieszcza się je w kolbie do kultur komórkowych. Następnego dnia należy zmienić podłoże. Komórki H295R hoduje się w inkubatorze w temperaturze 37 °C w warunkach, w których zawartość CO_2 w powietrzu wynosi 5 %, a podłoże zmienia się na nowe 2–3 razy w tygodniu. W momencie osiągnięcia przez komórki konfluencji na poziomie 85–90 %, należy je podzielić. Podział komórek jest konieczny, aby zapewnić zdrowie i wzrost komórek oraz aby utrzymać komórki do celów przeprowadzania testów biologicznych. Komórki płucze się trzykrotnie w roztworze chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS bez zawartości Ca^{2+} Mg^{2+}) i wydostaje się je z kolby do kultur komórkowych, dodając odpowiedni enzym powodujący oddzielenie, np. trypsynę, w PBS (bez zawartości Ca^{2+} Mg^{2+}). Natychmiast po oddzieleniu się komórek od kolby do kultur komórkowych należy zatrzymać działanie enzymu poprzez dodanie podłoża wzbogaconego w stosunku 3-krotności objętości zastosowanej do podania enzymu. Komórki umieszcza się w probówce wirówkowej, odwirowuje się je w temperaturze pokojowej, usuwa się supernatant i dokonuje się ponownego zawieszenia osadu komórek w podłożu wzbogaconym. Odpowiednią ilość roztworu z komórkami umieszcza się w nowej kolbie do kultur komórkowych. Ilość roztworu z komórkami należy dostosować tak, aby komórki osiągnęły stan konfluencji w ciągu 5–7 dni. Zalecany wskaźnik subhodowli wynosi 1:3–1:4. Płytkę należy ostrożnie oznakować. Komórki można teraz wykorzystać do celów testu, a ich nadmiar należy zamrozić w ciekłym azocie w sposób opisany w pkt 20.

([1]) „Nowa partia” odnosi się do świeżej partii komórek otrzymanych ze zbioru kultur typu amerykańskiego.

([2]) „Zamrożona partia” odnosi się do komórek, które zostały uprzednio wyhodowane, a następnie zamrożone w laboratorium, innych niż komórki ze zbioru kultur typu amerykańskiego.

▼M5

Zamrażanie komórek H295R (przygotowywanie komórek do przechowywania w ciekłym azocie)

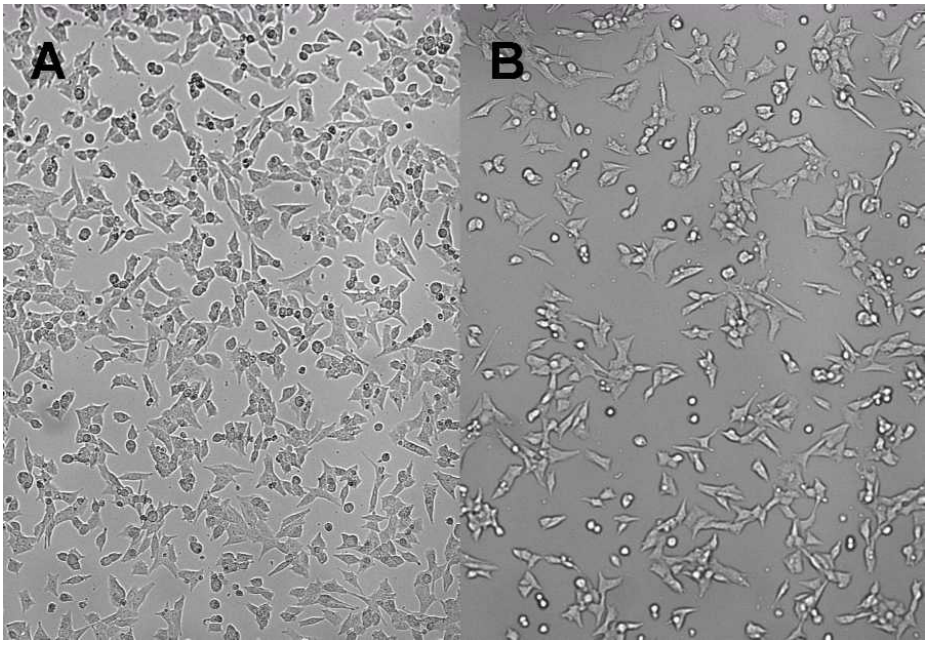
20. W celu przygotowania komórek H295R do zamrożenia należy stosować procedurę opisaną powyżej w odniesieniu do podziału komórek aż do etapu ponownego zawieszania osadu komórek na dnie probówki wirówkowej. Na tym etapie osad komórek ponownie zawiesza się w podłożu do zamrażania. Roztwór przenosi się do odpowiednio oznakowanej fiolki kriogenicznej i zamraża w temperaturze -80 °C na 24 godziny, a następnie fiolkę kriogeniczną umieszcza się w ciekłym azocie do celów przechowywania. Szczegóły dotyczące tej procedury przedstawiono w dodatku III do sprawozdania z walidacji (4).

Posiew i wstępna inkubacja tkanek do celów badania

21. Potrzebna liczba płytek 24-dołkowych, przygotowanych zgodnie z opisem w pkt 19, będzie uzależniona od liczby badanych substancji chemicznych i konfluencji komórek w naczyniach z kulturami. Zgodnie z zasadą ogólną jedna kolba do kultur komórkowych (75 cm^2) zawierająca komórki w stanie konfluencji na poziomie 80–90 % zapewni wystarczającą liczbę komórek dla 1–1,5 płytki (24-dołkowej) o gęstości docelowej wynoszącej 200 000–300 000 komórek na ml podłoża, co skutkuje uzyskaniem w dołkach konfluencji na poziomie 50–60 % po upływie 24 godzin (rys. 2). Stanowi to zazwyczaj optymalny poziom gęstości komórek do produkcji hormonów w teście. W przypadku wyższych gęstości schematy produkcji T i E2 ulegają zmianie. Przed przeprowadzeniem testu po raz pierwszy zaleca się zbadanie różnych gęstości posiewu między 200 000 a 300 000 komórek na ml oraz wybranie gęstości skutkującej konfluencją na poziomie 50–60 % w dołku po upływie 24 godzin do celów dalszych doświadczeń.

Rysunek 2

Mikrofotografia komórek H295R o zagęszczeniu na poziomie 50 % na płytce 24-dołkowej zawierającej kulturę komórkową wykonana w 24 godzinie na krańcu (A) i w środkowej części (B) dołka



22. Podłoże usuwa się z kolby do kultur komórkowych za pomocą pipety, a komórki płucze się 3-krotnie za pomocą sterylnego PBS (niezawierającego $Ca^{2+}Mg^{2+}$). Dodaje się roztwór enzymu (w PBS) w celu oddzielenia komórek od kolby do kultur komórkowych. Po upływie odpowiedniego czasu na oddzielenie się komórek należy zatrzymać działanie enzymu

▼M5

poprzez dodanie podłoża wzbogaconego w stosunku 3-krotności objętości zastosowanej do podania enzymu. Komórki umieszcza się w probówce wirówkowej, odwirowuje się je w temperaturze pokojowej, usuwa się supernatant i dokonuje się ponownego zawieszenia osadu komórek w podłożu wzbogaconym. Gęstość komórek oblicza się za pomocą np. hemocytometru lub narzędzia do liczenia komórek. Roztwór z komórkami należy rozcieńczyć do uzyskania oczekiwanej gęstości posiewu i dokładnie wymieszać, aby zapewnić jednorodną gęstość komórek. Należy dokonać posiewu komórek, stosując 1 ml roztworu z komórkami na dołek oraz oznakować płytki i dołki. Posiane płytki inkubuje się przez 24 godziny w temperaturze 37 °C w warunkach, w których zawartość CO_2 w powietrzu wynosi poniżej 5 %, aby umożliwić komórkom osadzenie się w dołkach.

WYMOGI W ZAKRESIE KONTROLI JAKOŚCI

23. Niezwykle istotne jest dostarczenie dokładnych objętości roztworów i próbek do dołków podczas dawkowania, ponieważ objętości te decydują o stężeniach wykorzystywanych w obliczeniach wyników testu.

24. Przed zainicjowaniem kultury komórkowej i rozpoczęciem wszelkich dalszych badań każde laboratorium powinno wykazać czułość swojego systemu pomiaru hormonów (pkt 29–31).

25. Jeżeli planuje się zastosowanie testów pomiaru hormonów na podstawie przeciwciał, badane substancje chemiczne należy poddać analizie pod kątem ich potencjału do zakłócania systemu pomiaru wykorzystywanego do ilościowego określenia T i E2, jak opisano w pkt 32, przed rozpoczęciem testów.

26. Zaleca się stosowanie sulfotlenku dimetylu (DMSO) jako rozpuszczalnika do celów testu. Jeżeli wykorzystuje się alternatywny rozpuszczalnik, należy określić:

— rozpuszczalność badanej substancji chemicznej, forskoliny i prochlorazu w rozpuszczalniku, oraz

— cytotoksyczność jako funkcję stężenia rozpuszczalnika.

Zaleca się, aby maksymalne dopuszczalne stężenie rozpuszczalnika nie przekraczało 10-krotnej wartości rozcieńczenia najmniej cytotoksycznego stężenia rozpuszczalnika.

27. Przed przeprowadzeniem badań po raz pierwszy laboratorium powinno wykonać doświadczenie kwalifikujące, mające na celu wykazanie, że laboratorium posiada zdolność do utrzymania i uzyskania odpowiedniej kultury komórkowej i warunków doświadczalnych wymaganych do celów badań substancji chemicznych, jak opisano w pkt 33–35.

28. Rozpoczynając badania z wykorzystaniem nowej partii, należy przeprowadzić analizę płytki kontrolnej przed zastosowaniem nowej partii komórek do oceny efektywności komórek, jak opisano w pkt 36 i 37.

Sprawność systemu pomiaru hormonów

Czułość, dokładność, precyzja i reaktywność krzyżowa metody wraz z przykładową matrycą

29. Każde laboratorium może stosować dowolny system pomiaru hormonów do celów analizy produkcji T i E2 przez komórki H295R, pod warunkiem że spełnia on wymogi w zakresie sprawności, w tym wymogi dotyczące granicy oznaczalności (LOQ). Nominalnie granice te wynoszą 100 pg/ml dla T i 10 pg/ml dla E2 i opierają się na podstawowych poziomach hormonów zaobserwowanych podczas badań walidacyjnych. Wyższe lub niższe poziomy mogą być jednak odpowiednie w zależności od podstawowych poziomów hormonów, jakie uzyskano w laboratorium przeprowadzającym badania. Przed rozpoczęciem analizy płytki kontroli jakości i prób

▼M5

badawczych laboratorium powinno wykazać, że za pomocą planowanego test hormonów można dokonywać pomiaru stężeń hormonów w podłożu wzbogaconym z wystarczającą dokładnością i precyzją, tak aby spełnić kryteria w zakresie kontroli jakości określone w tabelach 1 i 5, poprzez dokonanie analizy podłoża wzbogaconego uzupełnionego o substancję do wewnętrznej kontrolni hormonów. Podłoże wzbogacone należy uzupełnić o co najmniej trzy stężenia każdego hormonu (np. 100, 500 i 2 500 pg/ml T; 10, 50 i 250 pg/ml E2; lub można użyć najniższych możliwych stężeń na podstawie granic wykrywalności wybranego systemu pomiaru hormonów w odniesieniu do najniższych uzupełniających stężeń T i E2), a następnie poddać analizie. Zmierzone stężenia hormonów z nieekstrahowanych próbek powinny wynosić około 30 % stężeń nominalnych, a zmienność między pomiarami kontrpróbek z tej samej próbki nie powinna przekraczać 25 % (aby uzyskać dodatkowe kryteria w zakresie kontroli jakości, zob. także tabela 8). Jeżeli powyższe kryteria w zakresie kontroli jakości zostaną spełnione, przyjmuje się, że wybrany test pomiaru hormonów jest wystarczająco dokładny i precyzyjny i nie wchodzi w reakcję krzyżową ze składnikami podłoża (przykładowa matryca) w taki sposób, że można byłoby oczekiwać istotnego wpływu na wynik testu. W związku z tym nie wymaga się ekstrakcji próbek przed dokonaniem pomiaru hormonów.

30. Jeżeli kryteria w zakresie kontroli jakości przedstawione w tabelach 1 i 8 nie zostaną spełnione, może nastąpić istotny wpływ na matrycę i wówczas należy przeprowadzić doświadczenie z ekstrahowanym podłożem uzupełnionym. Przykład procedury ekstrakcji przedstawiono w dodatku II do sprawozdania z walidacji (4). Pomiary stężeń hormonów w ekstrahowanych próbkach należy przeprowadzić trzykrotnie ([1]). Jeżeli można wykazać, że po dokonaniu ekstrakcji składniki podłoża nie zakłócają metody wykrywania hormonów zgodnie z kryteriami w zakresie kontroli jakości, wszelkie dalsze doświadczenia należy przeprowadzać przy użyciu ekstrahowanych próbek. Jeżeli po dokonaniu ekstrakcji kryteria kontroli jakości nie mogą zostać spełnione, stosowany system pomiaru hormonów nie jest odpowiedni do testu steroidogenezy H295R i należy wykorzystać inną metodę wykrywania hormonów.

Krzywa wzorcowa

31. Stężenia hormonów w kontroli rozpuszczalnika (KR) powinny mieścić się w zakresie liniowym krzywej wzorcowej. Pożądane jest, aby wartości KR znalazły się w pobliżu środkowej części zakresu liniowego, dzięki czemu możliwy będzie pomiar wywołania i zahamowania syntezy hormonów. Należy odpowiednio wybrać rozcieńczenia podłoża (lub ekstraktów), które mają zostać zmierzone. Zależność liniową należy określić przy zastosowaniu odpowiedniego podejścia statystycznego.

Badanie interferencji chemicznej

32. W przypadku gdy do pomiaru hormonów mają zostać zastosowane testy oparte na przeciwciałach, takie jak testy immunoenzymatyczne (ELISA) i metody radioimmunologiczne (RIA), każdą substancję chemiczną należy zbadać pod kątem potencjalnej interferencji z systemem pomiaru hormonów, który ma zostać wykorzystany, przed rozpoczęciem faktycznego badania substancji chemicznych (dodatek III do sprawozdania z walidacji (4)), ponieważ niektóre substancje chemiczne mogą zakłócać wspomniane badania (17). W przypadku wystąpienia interferencji na poziomie ≥ 20 % podstawowej produkcji hormonów w odniesieniu do T lub E2, jak określono na podstawie analizy hormonów, należy przeprowadzić badanie interferencji chemicznej dla testu hormonów (jak opisano w sekcji 5.0 dodatku III do sprawozdania z walidacji (4)) w odniesieniu do wszystkich rozcieńczeń roztworów wyjściowych substancji chemicznych w celu zidentyfikowania progu dawki, przy której występuje istotna interferencja (≥ 20 %). Jeżeli interferencja nie przekracza 30 %, wyniki można skorygować o wartość tej interferencji. Jeżeli interferencja przekracza 30 %, otrzymane dane są nieważne i należy odrzucić dane dotyczące odnośnych stężeń.

([1]) *Uwaga:* Jeżeli ekstrakcja jest wymagana, dokonuje się trzech kontrpomiarów w odniesieniu do każdego ekstraktu. Każda próbka zostanie poddana ekstrakcji tylko raz.

▼M5

Jeżeli istotna interferencja badanej substancji chemicznej z systemem pomiaru hormonów wystąpi w przypadku więcej niż jednego niecytotoksycznego stężenia, należy zastosować inny system pomiaru hormonów. W celu uniknięcia interferencji wynikającej z zanieczyszczania substancji chemicznych zaleca się dokonywanie ekstrakcji hormonów z podłoża za pomocą odpowiedniego rozpuszczalnika; możliwe metody przedstawiono w sprawozdaniu z walidacji (4).

Tabela 1

Kryteria sprawności w odniesieniu do systemów pomiaru hormonów

Parametr	Kryterium
Czułość metody pomiaru	Granica oznaczalności (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ([a])
Efektywność ekstrakcji hormonów (jedynie w przypadku, gdy ekstrakcja jest konieczna)	Średnie wskaźniki odzysku (na podstawie trzykrotnych pomiarów) w odniesieniu do dodanych ilości hormonów nie powinny odbiegać o więcej niż 30 % od ilości, która została dodana.
Interferencja chemiczna (jedynie w przypadku systemów opartych na przeciwciałach)	Nie powinna nastąpić istotna (≥ 30 % podstawowej produkcji odpowiedniego hormonu) reakcja krzyżowa z żadnym hormonem produkowanym przez komórki ([b]) ([c])

([a]) *Uwaga:* Granice pomiaru metody ustalono na podstawie podstawowych wartości dotyczących produkcji hormonów przedstawionych w tabeli 5 i zależą one od wyników. Jeżeli możliwe jest otrzymanie większej podstawowej produkcji hormonów, granica może być wyższa.

([b]) Niektóre przeciwciała T i E2 mogą wchodzić w reakcję krzyżową odpowiednio z androstenedionem i estronem przy wyższej zawartości procentowej. W takich przypadkach dokładne określenie wpływu na 17β-hydroksysteroid nie jest możliwe. Uzyskane dane mogą jednak w dalszym ciągu stanowić źródło przydatnych informacji na temat ogólnego wpływu na produkcję estrogenu lub androgenu. W takich przypadkach dane należy wyrazić jako reakcje androgenowe/estrogenowe, a nie reakcje 17β-estradiolowe i testosteronowe.

([c]) Obejmują one: cholesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deoksykortykosteron, kortykosteron, aldosteron, 17α-pregnenolon, 17α-progesteron, deoksykortyzol, kortyzol, dehydroepiandrosteron, androstenedion i estron.

Badanie biegłości laboratorium

33. Przed rozpoczęciem badania nieznanych substancji chemicznych laboratorium powinno wykazać zdolność do uzyskania i utrzymywania odpowiedniej kultury komórkowej i odpowiednich warunków badań, wymaganych do skutecznego przeprowadzenia testu, wykonując badanie biegłości laboratorium. Ponieważ wynik testu bezpośrednio zależy od pracowników laboratorium przeprowadzających test, procedury te należy częściowo powtarzać, jeżeli nastąpi zmiana personelu laboratorium.

34. Takie badanie biegłości zostanie przeprowadzone w takich samych warunkach jak warunki wymienione w pkt 38–40, poprzez narażenie komórek na 7 zwiększanych stężeń substancji o silnym, umiarkowanym i słabym działaniu wywołującym i hamującym oraz substancji kontroli ujemnej (zob. tabela 2). Badane substancje chemiczne obejmują w szczególności forskolinę o silnym działaniu wywołującym (nr CAS 66575-29-9); prochloraz o silnym działaniu hamującym (nr CAS 67747-09-5); atrazynę o umiarkowanym działaniu wywołującym (nr CAS 1912-24-9); aminoglutetymid o umiarkowanym działaniu hamującym (nr CAS 125-84-8); bisfenol A o słabym

▼M5

działaniu wywołującym (produkcja E2) i słabym działaniu hamującym (produkcja T) (nr CAS 80-05-7); oraz ludzką gonadotropinę kosmówkową (hCG) do kontroli ujemnej (nr CAS 9002-61-3), jak przedstawiono w tabeli 2. Dla wszystkich substancji chemicznych stosuje się oddzielne płytki zgodnie ze schematem przedstawionym w tabeli 6. Jedną płytkę kontroli jakości (pkt 36–37, tabela 4) należy dołączyć do każdej próby dziennej w odniesieniu do substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości.

Tabela 2

Substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości i stężeń narażenia

Substancja chemiczna przeznaczona do oceny biegłości	Badane stężenia [μM]
Prochloraz	0 (a); 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Forskolina	0 (a); 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30
Atrazyna	0 (a); 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Aminoglutetymid	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 (0) rozpuszczalnika (DMSO), 1 μl DMSO/dołek

Podczas badania biegłości laboratorium poddanie komórek H295R działaniu substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości należy przeprowadzać przy użyciu płytek 24-dołkowych. Dawkowanie w odniesieniu do wszystkich dawek badanych substancji chemicznych wyraża się w μM. Należy podawać dawki w DMSO o stężeniu 0,1 % v/v na dołek. Wszystkie badane stężenia należy badać z zastosowaniem trzech dołków dla każdego poziomu stężenia (tabela 6). W odniesieniu do każdej substancji chemicznej stosuje się oddzielne płytki. Jedną płytkę kontroli jakości dołącza się do każdej próby dziennej.

35. Analizę żywotności komórek i analizę hormonów należy przeprowadzać zgodnie z opisem zawartym w pkt 42–46. Wartość progową (najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, LOEC) i decyzję dotyczącą klasyfikacji należy odnotować i porównać z wartościami przedstawionymi w tabeli 3. Dane uznaje się za dopuszczalne, jeżeli spełniają wymogi w zakresie LOEC i klasyfikacji decyzji przedstawione w tabeli 3.

Tabela 3

Wartości progowe (LOEC) i klasyfikacje decyzji w odniesieniu do substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości

	Nr CAS	LOEC [μM]		Klasyfikacja decyzji	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ (a) (zahamowanie)	+ (zahamowanie)
Forskolina	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (indukcja)	+ (indukcja)
Atrazyna	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (indukcja)	+ (indukcja)
Aminoglutetymid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (zahamowanie)	+ (zahamowanie)

▼M5

	Nr CAS	LOEC [μM]		Klasyfikacja decyzji	
		T	E2	T	E2
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (zahamowanie)	+ (indukcja)
hCG	9002-61-3	Nie dotyczy	Nie dotyczy	ujemna	ujemna

([a]) +, dodatnia
Nie dotyczy: nie dotyczy, ponieważ nie oczekuje się wystąpienia zmian po narażeniu na niecytotoksyczne stężenia substancji kontroli ujemnej.

Płytka kontroli jakości

36. Płytkę kontroli jakości (QC) stosuje się w celu zweryfikowania efektywności komórek H295R w standardowych warunkach hodowli oraz utworzenia historycznej bazy danych stężeń hormonów w kontrolach rozpuszczalnika, kontrolach dodatnich i ujemnych, jak również innych pomiarów kontroli jakości w czasie:

— efektywność komórek H295R należy oceniać, stosując płytkę kontroli jakości dla każdej nowej partii ATCC lub po wykorzystaniu uprzednio zamrożonego zapasu komórek po raz pierwszy, chyba że przeprowadzono badanie biegłości laboratorium (pkt 32–34) przy użyciu tej partii komórek,

— płytka kontroli jakości pozwala na kompleksową ocenę warunków testu (np. żywotności komórek, kontroli rozpuszczalnika, kontroli ujemnych i dodatnich oraz zmienności w obrębie testów i między testami) podczas badania substancji chemicznych i powinna stanowić część każdej próby badawczej.

37. Badanie w zakresie kontroli jakości przeprowadza się przy użyciu płytki 24-dołkowej i zgodnie z tymi samymi procedurami dotyczącymi inkubacji, dawkowania, żywotności/cytotoksyczności komórek, ekstrakcji hormonów i analizy hormonów, które opisano w pkt 38–46 w odniesieniu do badania substancji chemicznych. Płytka kontroli jakości zawiera próby ślepe, kontrole rozpuszczalnika oraz dwa stężenia znanej substancji indukcyjnej (forskolinę, 1, 10 μM) i inhibitora (prochloraz, 0,1, 1 μM) syntezy E2 i T. Ponadto w wybranych dołkach stosuje się MeOH jako kontrolę dodatnią w teście żywotności/cytotoksyczności. Szczegółowy opis układu płytki przedstawiono w tabeli 4. Kryteria, które należy spełnić w odniesieniu do płytki kontroli jakości, wymieniono w tabeli 5. Zarówno w przypadku dołków kontroli rozpuszczalnika, jak i dołków próby ślepej należy spełnić wymogi dotyczące minimalnej podstawowej produkcji hormonów w odniesieniu do T i E2.

Tabela 4

Układ płytki kontroli jakości do celów badania efektywności nienarażonych komórek H295R i komórek narażonych na działanie znanych inhibitorów (PRO = prochloraz) i stymulatorów (FOR = forskolina) produkcji E2 i T. Po zakończeniu narażenia i usunięciu podłoża do wszystkich dołków zawierających MeOH dodany zostanie 70-procentowy roztwór metanolu, służący jako kontrola dodatnia dla cyctotoksyczności (zob. test cytotoksyczności w dodatku III do sprawozdania z walidacji (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Próba ślepa ([a])	Próba ślepa ([a])	Próba ślepa ([a])	Próba ślepa ([a]) (+ MeOH) ([b])	Próba ślepa ([a]) (+ MeOH) ([b])	Próba ślepa ([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]) Komórki w dołkach próby ślepej otrzymują jedynie podłoże (tj. nie otrzymują rozpuszczalnika).
([b]) Metanol (MeOH) zostanie dodany **po** zakończeniu narażenia i usunięciu podłoża z tych dołków.
([c]) DMSO kontrola rozpuszczalnika (1 μl/dołek).

Tabela 5

Kryteria efektywności w odniesieniu do płytki kontroli jakości

	T	E2
Podstawowa produkcja hormonów w kontroli rozpuszczalnika	≥ 5-krotność granicy oznaczalności	≥ 2,5-krotność granicy oznaczalności
Indukcja (10 μM forskoliny)	≥ 1,5-krotność kontroli rozpuszczalnika	≥ 7,5-krotność kontroli rozpuszczalnika
Zahamowanie (1μM prochlorazu)	≤ 0,5-krotność kontroli rozpuszczalnika	≤ 0,5-krotność kontroli rozpuszczalnika

PROCEDURA NARAŻENIA NA SUBSTANCJE CHEMICZNE

38. Komórki preinkubowane usuwa się z inkubatora (pkt 21) i sprawdza się je pod mikroskopem, aby upewnić się, że są one w dobrym stanie (łączenie, morfologia), zanim rozpocznie się dawkowanie.

39. Komórki umieszcza się w szafce zapewniającej bezpieczeństwo biologiczne, a następnie usuwa się podłoże wzbogacone i zastępuje się je nowym podłożem wzbogaconym (1 ml/dołek). Do celów tej metody preferowanym rozpuszczalnikiem jest DMSO. Jeżeli istnieją jednak względy przemawiające za zastosowaniem innych rozpuszczalników, należy przedstawić uzasadnienie naukowe. Komórki naraża się na działanie badanej substancji chemicznej poprzez dodanie 1 μl odpowiedniego roztworu podstawowego w DMSO (zob. dodatek II do sprawozdania z walidacji (4)) na 1 ml podłoża wzbogaconego (objętość dołka). Dzięki temu uzyskuje się stężenie końcowe w dołkach na poziomie 0,1 % DMSO. Aby zapewnić odpowiednie mieszanie, zaleca się zasadniczo zmieszanie odpowiedniego roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej w DMSO z podłożem wzbogaconym celem uzyskania pożądanego stężenia końcowego dla każdej dawki oraz dodanie mieszaniny do każdego dołka natychmiast po usunięciu starego podłoża. W przypadku zastosowania tego wariantu należy zachować jednakowe stężenie DMSO (0,1 %) we wszystkich dołkach. Dołki zawierające dwa największe stężenia ocenia się wzrokowo przy użyciu mikroskopu stereoskopowego pod kątem tworzenia się osadów lub zmętnienia, które stanowią wskaźniki niepełnego rozpuszczenia się badanej substancji chemicznej. W przypadku zaobserwowania takich zjawisk (zmętnienia, tworzenia się osadów) badaniu poddaje się także dołki zawierające kolejne niższe stężenia (itd.), a stężenia, które nie przekształciły się w pełni w roztwór, należy wyłączyć z dalszej oceny i analizy. Płytkę ponownie umieszcza się na 48 godzin w inkubatorze w temperaturze 37 °C w warunkach, w których zawartość CO_2 w powietrzu wynosi 5 %. Układ płytki zawierającej badaną substancję chemiczną przedstawiono w tabeli 6. Roztwory podstawowe 1–7 przedstawiają rozmieszczenie rosnących dawek badanej substancji chemicznej.

▼M5

Tabela 6

Schemat dawkowania przy poddawaniu komórek H295R działaniu badanej substancji chemicznej na płytce 24-dołkowej

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Roztwór podstawowy 4	Roztwór podstawowy 4	Roztwór podstawowy 4
B	Roztwór podstawowy 1	Roztwór podstawowy 1	Roztwór podstawowy 1	Roztwór podstawowy 5	Roztwór podstawowy 5	Roztwór podstawowy 5
C	Roztwór podstawowy 2	Roztwór podstawowy 2	Roztwór podstawowy 2	Roztwór podstawowy 6	Roztwór podstawowy 6	Roztwór podstawowy 6
D	Roztwór podstawowy 3	Roztwór podstawowy 3	Roztwór podstawowy 3	Roztwór podstawowy 7	Roztwór podstawowy 7	Roztwór podstawowy 7

40. Po upływie 48 godzin płytki poddane działaniu substancji chemicznych wyjmuje się z inkubatora i sprawdza się każdy dołek pod mikroskopem pod kątem stanu komórek (łączenie, morfologia, poziom konfluencji) i oznak cytotoksyczności. Podłoże z każdego dołka dzieli się na dwie równe części (po około 490 µl) i umieszcza się w dwóch oddzielnych, odpowiednio oznakowanych fiolkach (tj. jeden alikwot jako zapasowa próbka dla każdego dołka). Aby zapobiec wysychaniu komórek, podłoże usuwa się stopniowo, wyjmując za każdym razem jeden rząd lub jedną kolumnę, i zastępuje podłożem służącym do testu żywotności/cytotoksyczności komórek. Jeżeli nie planuje się natychmiastowego pomiaru żywotności/cytotoksyczności komórek, do każdego dołka należy dodać 200 µl PBS zawierającego Ca^{2+} i Mg^{2+}. Podłoża zamraża się w temperaturze – 80 °C aż do dalszego przetwarzania celem dokonania analizy stężeń hormonów (zob. pkt 44–46). Podczas gdy T i E2 w podłożu przechowywanym w temperaturze – 80 °C są ogólnie stabilne przez co najmniej 3 miesiące, stabilność hormonów w trakcie przechowywania należy dokumentować w obrębie każdego laboratorium.

41. Natychmiast po usunięciu podłoża należy dokonać oznaczenia żywotności/cytotoksyczności komórek dla każdej płytki poddawanej działaniu substancji chemicznej.

Oznaczanie żywotności komórek

42. W celu określenia potencjalnego wpływu badanej substancji chemicznej na żywotność komórek można wykorzystać dowolny test żywotności/cytotoksyczności komórek. Dany test powinien umożliwić uzyskanie prawdziwej miary wartości procentowej żywotnych komórek obecnych w dołku lub powinien pozwolić na wykazanie, że jest bezpośrednio porównywalny do (funkcji liniowej) testu Live/Dead® (zob. dodatek III do sprawozdania z walidacji (4)). Test cytotoksyczności MTT [bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowego] (18) stanowi alternatywny test, w przypadku którego wykazano równie skuteczne działanie. Ocena żywotności komórek przy zastosowaniu powyższych metod stanowi względny pomiar, który niekoniecznie wskazuje na obecność liniowych zależności z bezwzględną liczbą komórek w dołku. W związku z tym badacz powinien przeprowadzić równoległą, subiektywną ocenę wzrokową każdego dołka oraz wykonać cyfrowe zdjęcia kontroli rozpuszczalnika i dwóch najwyższych stężeń niecytotoksycznych i umieścić je w archiwum, aby umożliwić późniejszą ocenę faktycznej gęstości komórek, jeżeli będzie to wymagane. Jeżeli poprzez ocenę wzrokową lub po wykazaniu w drodze testu żywotności/cytotoksyczności komórek, wydaje się, że następuje wzrost liczby komórek, należy dokonać weryfikacji tego pozornego wzrostu. Jeżeli wzrost liczby komórek zostanie potwierdzony, należy odnotować to w sprawozdaniu z badania. Żywotność komórek będzie wyrażona w stosunku do średniej reakcji kontroli rozpuszczalnika, uznanych za komórki w 100 % żywotne i oblicza się ją w sposób odpowiedni dla stosowanej metody testu żywotności/cytotoksyczności. W przypadku testu cytotoksyczności MTT, można zastosować następujący wzór:

▼M5

% żywotnych komórek = (reakcja w dołku – średnia reakcja w dołkach, w których podawano MeOH [= 100 % martwych] – (średnia reakcja w dołkach zawierających kontrole rozpuszczalnika – średnia reakcja w dołkach, w których podawano MeOH [= 100 % martwych]

43. Danych pochodzących z dołków o żywotności poniżej 80 % w stosunku do średniej żywotności w kontrolach rozpuszczalnika (= 100 % żywotności) nie należy uwzględniać w ostatecznej analizie danych. Zahamowanie steroidogenezy występujące w przypadku około 20-procentowej cytotoksyczności należy oceniać w sposób ostrożny, aby mieć pewność, że cytotoksyczność nie była przyczyną zahamowania.

Analiza hormonów

44. W każdym laboratorium można stosować dowolny system pomiaru hormonów do celów analizy T i E2. Zapasowe alikwoty podłoża z każdej grupy badanej mogą zostać wykorzystane do sporządzenia rozcieńczeń, aby sprowadzić stężenie do liniowej części krzywej wzorcowej. Jak opisano w pkt 29, każde laboratorium powinno wykazać zgodność stosowanego systemu pomiaru hormonów (np. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) z kryteriami kontroli jakości poprzez dokonanie analizy podłoża wzbogaconego uzupełnionego o substancję do wewnętrznej kontrolni hormonów przed przeprowadzeniem prób kontroli jakości lub testów substancji chemicznych. W celu zapewnienia, że składniki systemu badań nie zakłócają pomiaru hormonów, może zajść potrzeba ekstrakcji hormonów z podłoży przed dokonaniem ich pomiaru (w celu uzyskania informacji dotyczących warunków, w których ekstrakcja jest lub nie jest wymaga, zob. pkt 30). Zaleca się przeprowadzenie ekstrakcji zgodnie z procedurami przedstawionymi w dodatku III do sprawozdania z walidacji (4).

45. Jeżeli do pomiaru hormonów wykorzystuje się dostępny na rynku zestaw do przeprowadzania badań, analizy hormonów należy dokonywać, stosując się do instrukcji dołączonych przez producenta zestawu do przeprowadzania badań. Większość producentów stosuje swoiste procedury, zgodnie z którymi należy przeprowadzać analizy. Rozcieńczenia próbek należy dostosować w taki sposób, aby oczekiwane stężenia hormonów dla kontroli rozpuszczalnika mieściły się w środkowej części liniowego zakresu krzywej wzorcowej dla pojedynczego testu (dodatek III do sprawozdania z walidacji (4)). Wartości znajdujące się poza liniowym zakresem krzywej wzorcowej należy odrzucić.

46. Ostateczne stężenia hormonów oblicza się w następujący sposób:

Przykład:

ekstrahowane:	450 µl podłoża
odtworzone w:	250 µl buforu testowy
rozcieńczenie w teście:	1:10 (aby próbka mieściła się w zakresie liniowym krzywej wzorcowej)
stężenie hormonów w teście:	150 pg/ml (po dostosowaniu do stężenia na ml testowanej próbki)
odzysk:	89 %
ostateczne stężenie hormonów =	(stężenie hormonów (na ml) ÷ odzysk) (współczynnik rozcieńczenia)
ostateczne stężenie hormonów =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Dobór badanych stężeń

47. W ramach testu należy przeprowadzić co najmniej dwie niezależne próby. Jeżeli wcześniejsze dane, takie jak informacje dotyczące granic rozpuszczalności lub cytotoksyczności, nie stanowią podstawy doboru badanych stężeń, zaleca się rozmieszczenie badanych stężeń do celów próby wstępnej w podziałce logarytmicznej $\log_{10}$ z maksymalnym stężeniem w wysokości 10^{-3} M. Jeżeli substancja chemiczna jest rozpuszczalna i nie wykazuje właściwości cytotoksycznych przy żadnym badanym stężeniu, a wynik pierwszej próby w ramach testu był ujemny, należy to potwierdzić, przeprowadzając jeszcze jedną próbę w takich samych warunkach, w jakich przeprowadzono pierwszą próbę (tabela 7). Jeżeli wyniki pierwszej próby są *niejednoznaczne* (tj. zmiana krotności jest istotna statystycznie w przypadku kontroli rozpuszczalnika przy wyłącznie jednym stężeniu) lub dodatnia (tj. zmiana krotności przy dwóch lub większej liczbie sąsiadujących stężeń jest istotna statystycznie), należy powtórzyć badanie, jak wskazano w tabeli 7, poprzez dostosowanie wybranych badanych stężeń. Badane stężenia w próbie drugiej i trzeciej (w razie potrzeby) należy dostosować na podstawie wyników próby wstępnej, ograniczając stężenia, które wywołały działanie, przy zastosowaniu zakresu stężeń w wysokości 1/2-log (np. jeżeli wynikiem pierwotnej próby obejmującej 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000 µM były indukcje przy wartościach 1 i 10 µM, w drugiej próbie należy użyć badanych stężeń w wysokości 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 µM), chyba że konieczne będzie zastosowanie niższych stężeń, aby osiągnąć LOEC. W ostatnim przypadku w drugiej próbie należy użyć co najmniej pięciu stężeń poniżej najniższego stężenia badanego w pierwszej próbie, stosując zakres skalę logarytmiczną 1/2-log. Jeżeli druga próba nie potwierdzi wyników uzyskanej w pierwszej próbie (tj. nie nastąpi istotność statystyczna przy wcześniej badanych stężeniach, które osiągnęły wynik dodatni ± 1 przyrost stężenia), należy przeprowadzić trzecie doświadczenie z zastosowaniem pierwotnych warunków badania. Niejednoznaczne wyniki uzyskane w pierwszej próbie uznaje się za ujemne, jeżeli zaobserwowany wpływ może zostać potwierdzony w którejkolwiek z kolejnych dwóch prób. Niejednoznaczne wyniki uznaje się za dodatnie reakcje (dodatni wpływ), jeżeli reakcje te mogą zostać potwierdzone w co najmniej jeszcze jednej próbie i mieszczą się w zakresie ± 1 przyrost stężenia (aby uzyskać informacje dotyczące procedury interpretacji danych zob. pkt 55).

Tabela 7

Matryca decyzji w odniesieniu do możliwych scenariuszy wyników

Próba 1	Próba 2		Próba 3		Decyzja	
Scenariusz	Decyzja	Scenariusz	Decyzja	Scenariusz	Wynik dodatni	Wynik ujemny
Wynik ujemny	Potwierdzić ([a])	Wynik ujemny	Zatrzymać			X
Wynik ujemny	Potwierdzić ([a])	Wynik dodatni	Dostosować ([b])	Wynik ujemny		X
Wynik niejednoznaczny ([c])	Dostosować ([b])	Wynik ujemny	Potwierdzić ([a])	Wynik ujemny		X
Wynik niejednoznaczny ([c])	Dostosować ([b])	Wynik ujemny	Potwierdzić ([a])	Wynik dodatni	X	
Wynik niejednoznaczny ([c])	Dostosować ([b])	Wynik dodatni			X	
Wynik dodatni	Dostosować ([b])	Wynik ujemny	Potwierdzić ([a])	Wynik dodatni	X	

▼M5

Próba 1	Próba 2		Próba 3		Decyzja	
Scenariusz	Decyzja	Scenariusz	Decyzja	Scenariusz	Wynik dodatni	Wynik ujemny
Wynik ujemny	Potwierdzić [a]	Wynik dodatni	Dostosować [b]	Wynik dodatni	X	
Wynik ujemny	Dostosować [b]	Wynik dodatni	Zatrzymać		X	

[a] Należy potwierdzić poprzednią próbę, stosując ten sam schemat badań.
[b] Należy powtórzyć test, stosując rozkład stężeń w skali logarytmicznej 1/2-log (ograniczanie stężenia, które w poprzednim badaniu dało wynik różniący się w znacznym stopniu).
[c] Zmiana krotności przy jednym stężeniu jest istotnie statystycznie różna od KR.

Kontrola jakości płytki do badań

48. Poza spełnieniem kryteriów mających zastosowanie do płytki kontroli jakości, należy spełnić również inne kryteria jakości, przedstawione w tabeli 8, które dotyczą dopuszczalnej zmienności między odtwarzanymi dołkami, odtwarzanych eksperymentów, liniowości i czułości systemów pomiaru hormonów, zmienności między odtwarzanymi pomiarami hormonów w tej samej próbce oraz odzysk wzbogaceń hormonami wyrażony w procentach po ekstrakcji podłoża (w stosownych przypadkach; aby uzyskać szczegółowe informacje na temat wymogów w zakresie ekstrakcji zob. pkt 30). Dane powinny zawierać się w dopuszczalnych zakresach zdefiniowanych w odniesieniu do każdego parametru, aby można je było uwzględnić w dalszej ocenie. Jeżeli kryteria te nie zostaną spełnione, w arkuszu kalkulacyjnym należy odnotować, że kryteria kontroli jakości nie zostały spełnione w odniesieniu do danej próbki oraz że należy dokonać ponownej analizy tej próbki lub usunąć ją ze zbioru danych.

Tabela 8

Dopuszczalne zakresy lub dopuszczalna zmienność (%) w odniesieniu do parametrów płytki do badań w teście komórek H295R

(LOQ: granica oznaczalności systemu pomiaru hormonów. CV: współczynnik zmienności; KR: kontrola rozpuszczalnika; DPM: liczba rozpadów na minutę)

	Porównanie	T	E2
Podstawowa produkcja hormonów w kontrolach rozpuszczalnika	Krotność wyższa niż LOQ	≥ 5-ciokrotna	≥ 2,5-krotna
Badanie narażenia — w ramach współczynnika zmienności płytki w odniesieniu do kontroli rozpuszczalnika (odtwarzane dołki)	Stężenia bezwzględne	≤ 30 %	≤ 30 %
Badanie narażenia — między współczynnikiem zmienności płytki w odniesieniu do kontroli rozpuszczalnika (odtwarzane doświadczenia)	Zmiana krotności	≤ 30 %	≤ 30 %
System pomiaru hormonów — czułość	Wykrywalny krotny spadek w stosunku do kontroli rozpuszczalnika	≥ 5-krotna	≥ 2,5-krotna
System pomiaru hormonów — powtórzony pomiar współczynnika zmienności w odniesieniu do kontroli rozpuszczalnika [a]	Stężenia bezwzględne	≤ 25 %	≤ 25 %
Ekstrakcja podłoża — odzysk standardu wewnętrznego 3H (w razie potrzeby)	Liczba rozpadów na minutę	≥ 65 % nominalnie	

[a] Odnosi się do powtrzanych pomiarów tej samej próbki.

▼M5

ANALIZA DANYCH I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Analiza danych

49. Aby dokonać oceny względnego wzrostu/spadku chemicznie zmienionej produkcji hormonów, wyniki należy znormalizować do średniej wartości KR każdej płytki do badań, a wyniki wyrazić jako zmiany względem kontroli rozpuszczalnika w każdej badanej płytce. Wszystkie dane należy wyrażać jako średnia ± 1 odchylenie standardowe (SD).

50. W analizie danych należy uwzględnić jedynie dane dotyczące hormonów z dołków, w których cytotoksyczność nie przekroczyła poziomu 20 %. Względne zmiany należy obliczać w następujący sposób:

Względna zmiana = (stężenie hormonów w każdym dołku) ÷ (średnie stężenie hormonów we wszystkich dołkach kontroli rozpuszczalnika).

51. Jeżeli poprzez kontrolę wzrokową dołka lub po wykazaniu w drodze testu żywotności/cytotoksyczności komórek opisanego w pkt 42 wydaje się, że następuje wzrost liczby komórek, należy dokonać weryfikacji tego pozornego wzrostu. Jeżeli wzrost liczby komórek zostanie potwierdzony, należy odnotować to w sprawozdaniu z badania.

52. Przed przeprowadzeniem analizy statystycznej należy dokonać oceny założeń dotyczących normalności i jednorodności zmienności. Oceny normalności należy dokonywać, stosując standardowe wykresy prawdopodobieństwa lub inną właściwą metodę statystyczną (np. test Shapiro-Wilka). Jeżeli dane (zmiany krotności) nie posiadają rozkładu normalnego, należy dokonać próby transformacji danych, aby zbliżyć je do rozkładu normalnego. Jeżeli dane posiadają rozkład normalny lub rozkład zbliżony do normlanego, należy dokonać analizy różnic między grupami stężeń substancji chemicznych i KR, stosując test parametryczny (np. test Dunnetta), w którym *stężenie* jest zmienną niezależną, a *reakcja* (zmiana krotności) jest zmienną zależną. Jeżeli dane nie posiadają rozkładu normalnego należy zastosować odpowiedni test nieparametryczny (np. test Kruskala-Wallisa, test sum rang Steele'a). Różnice uznaje się za istotne przy wartości $p \leq 0,05$. Statystycznych ocen dokonuje się w oparciu o średnie wartości dotyczące każdego dołka, które stanowią niezależne elementy danych. Oczekuje się, że z uwagi na znaczne przedziały między dawkami podczas pierwszej próby (skala logarytmiczna $\log_{10}$), w wielu przypadkach nie będzie możliwe określenie wyraźnych związków stężenie-reakcja, w przypadku których dwie największe dawki znajdą się w liniowej części krzywej sigmoidalnej. W związku z tym, dokonując pierwszej próby lub przy zastosowaniu wszelkich innych zbiorów danych, w przypadku których ten warunek zaistnieje (np. w przypadku, w którym nie można oszacować maksymalnego poziomu skuteczności), stosuje się statystykę stałych zmiennych typu I, jak opisano powyżej.

53. Jeżeli w liniowej części krzywej znajduje się większa liczba elementów danych niż dwa i w przypadku, gdy można obliczyć maksymalne poziomy skuteczności, czego oczekuje się w odniesieniu do niektórych z drugich prób przeprowadzanych przy zastosowaniu półlogarytmicznej skali przedziału stężeń ekspozycjnych, do obliczenia skutecznych stężeń (np.EC50 i EC20) należy wykorzystać model probitowy, logitowy lub inny właściwy model regresji.

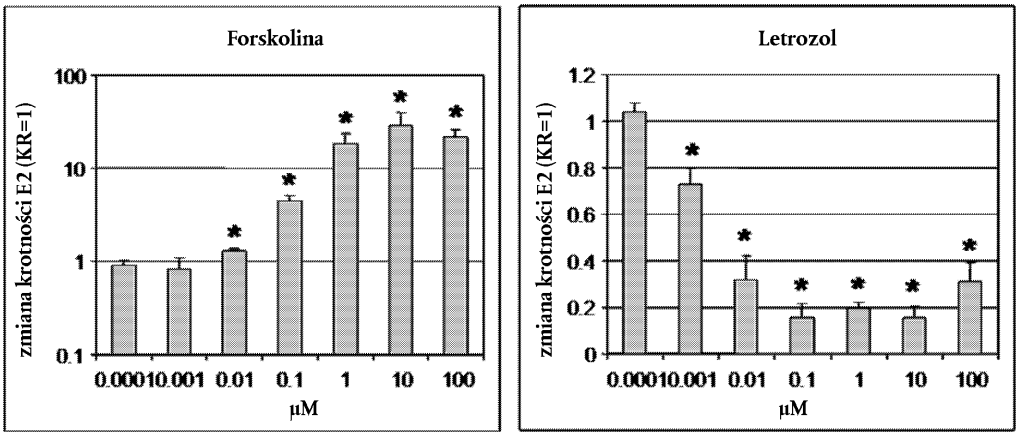
54. Wyniki należy przedstawić w formie graficznej (wykresu słupkowego przedstawiającego średnią +/– 1 odchylenie standardowe) i w formie tabeli (zawierającej LOEC/NOEC, kierunek działania i siłę maksymalnej reakcji, będącej częścią porcji danych dawka-odpowiedź) (przykład przedstawiono na rys. 3). Ocenę danych uznaje się za ważną, wyłącznie jeżeli dokonano jej na podstawie co najmniej dwóch niezależnie przeprowadzonych prób. Uznaje się, że badanie lub próba są niezależne, jeżeli zostały przeprowadzone w różnych terminach z zastosowaniem nowego zestawu roztworów i kontroli. Zakres stężeń, jakiego użyto w próbach 2 i 3 (w razie potrzeby), może zostać dostosowany na podstawie wyników próby 1, aby lepiej zdefiniować zakres reakcji na dawkę zawierający LOEC (zob. pkt 47).

▼M5

Rysunek 3

Przykład przedstawienia i oceny danych otrzymanych w trakcie testu H295R w postaci wykresu i tabeli

(Gwiazdką oznaczono istotne statystycznie różnice zaobserwowane w kontroli rozpuszczalnika (KR) ($p < 0,05$). LOEC: najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany; maksymalna zmiana: najwyższa siła reakcji zaobserwowana przy jakimkolwiek stężeniu w stosunku do średniej reakcji KR (= 1))



Substancja chemiczna	LOEC	Maksymalna zmiana
Forskolina	0,01	0,15-krotność
Letrozol	0,001	29-krotność

Procedura interpretacji danych

55. Uznaje się, że badana substancja chemiczna daje reakcję dodatnią, jeżeli krotność indukcji statystycznie różni się ($p \leq 0,05$) od kontroli rozpuszczalnika w dwóch sąsiadujących stężeniach w co najmniej dwóch niezależnych próbach (tabela 7). Uznaje się, że badana substancja chemiczna daje reakcją ujemną po przeprowadzeniu dwóch ujemnych prób lub w przypadku trzech prób obejmujących dwie próby ujemne i jedną niejednoznaczną lub dodatnią próbę. Jeżeli dane uzyskane podczas trzech niezależnych badań nie spełniają kryteriów decyzji wymienione w tabeli 7, wyniki badań nie nadają się do wykorzystania. Wyniki uzyskane przy stężeniach wykraczających poza granice rozpuszczalności lub przy stężeniach cytotoksycznych nie powinny być uwzględniane w interpretacji wyników.

Sprawozdanie z badania

56. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Placówka badawcza:

— nazwa placówki i lokalizacja,

— dane kierownika badań i pozostałych pracowników oraz opis ich obowiązków w zakresie badań,

— daty rozpoczęcia i zakończenia badań.

▼**M5**

Badana substancja chemiczna, odczynniki i substancje kontrolne:

— tożsamość (nazwa/nr CAS w stosownych przypadkach), źródło, numer partii/serii, czystość, dostawca, właściwości badanej substancji chemicznej, odczynników i substancji kontrolnych,

— cechy fizyczne i stosowne właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej,

— opis warunków przechowywania oraz metody i częstotliwości przygotowywania badanych substancji chemicznych, odczynników i substancji kontrolnych,

— stabilność badanej substancji chemicznej.

Komórki:

— źródło i rodzaj komórek,

— liczbę pasaży komórek (identyfikator pasażu komórek) używanych w badaniu,

— opis procedur stosowanych do utrzymywania kultur komórkowych.

Wymogi przed rozpoczęciem badań (w stosownych przypadkach):

— opis i wyniki badania interferencji chemicznego testu hormonów,

— opis i wyniki pomiarów efektywności ekstrakcji hormonów,

— krzywą wzorcową i krzywą kalibracyjną dla wszystkich przeprowadzanych testów analitycznych,

— granice oznaczalności wybranych testów analitycznych.

Warunki badań:

— skład podłoży,

— stężenie badanej substancji chemicznej,

— gęstość komórek (szacowane lub mierzone stężenia komórek w 24 i 48 godzinie),

— rozpuszczalność badanej substancji chemicznej (granica rozpuszczalności, jeżeli została określona),

— czas inkubacji i warunki inkubacji.

Wyniki badań:

— nieprzetworzone dane w odniesieniu do każdego dołka kontroli i badanych substancji chemicznych — każdy powtórzony pomiar w postaci danych pierwotnych uzyskanych za pomocą narzędzi do pomiaru produkcji hormonów (np. gęstości optycznej, jednostek fluorescencji, liczby rozkładów na minutę itd.),

— walidację normalności lub uzasadnienie transformacji danych,

— średnie poziomy reakcji +/- 1 odchylenie standardowe w odniesieniu do każdego dołka, w którym dokonuje się pomiaru,

— dane dotyczące cytotoksyczności (badane stężenia, które spowodowały cytotoksyczność),

— potwierdzenie, że spełniono kryteria kontroli jakości,

▼**M5**

— względna zmiana w stosunku do kontroli rozpuszczalnika skorygowana o cytotoksyczność,

— wykres słupkowy przedstawiający względne zmiany (zmiany krotności) przy każdym stężeniu, odchylenie standardowe oraz istotność statystyczna, co omówiono w pkt 49–54.

Interpretacja danych:

— należy zastosować procedurę interpretacji danych do wyników i omówić ustalenia.

Omówienie ustaleń:

— czy wyniki badania wskazują na jakiekolwiek możliwości, że na dane na temat T/E2 mogły wpłynąć pośrednie oddziaływania na szlak gluko- i minaralokortykoidowy?

Wnioski

LITERATURA

(1) OECD (2002), 'OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals' w dodatku 2 do rozdziału B.54 niniejszego załącznika.

(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, s. 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, s. 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, Paryż, dostępny na stronie internetowej: [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, Paryż, dostęp na stronie internetowej: [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', dostępny na stronie internetowej: 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, s. 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, s 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 731–737.

(16) Rozdział B.55 niniejszego załącznika: 'Test biologiczny Hershbergera na szczurach: krótkoterminowe badanie przesiewowe właściwości (anty)androgennych'.

(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, s. 222–231.

(18) Mosmann, T. (1983), 'Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays', *J. Immunol. Methods.,* 65, s. 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, s. 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, s. 484–492.

▼M5

Dodatek

DEFINICJE:

Konfluencja odnosi się do stopnia pokrycia lub rozrostu, na jaki pozwala się komórkom w podłożu.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

CV odnosi się do współczynnika zmienności i oznacza stosunek odchylenia standardowego rozkładu do jego średniej arytmetycznej.

CYP oznacza monooksygenazy cytochromu P450, rodzinę genów i enzymów z nich produkowanych, które uczestniczą w katalizie szeregu różnych reakcji biochemicznych, w tym w syntezie i metabolizmie hormonów sterydowych.

DPM oznacza liczbę rozpadów na minutę. Jest to liczba atomów w danej ilości materiału radioaktywnego, która uległa rozpadowi w ciągu jednej minuty.

E2 to 17β-estradiol, najważniejszy estrogen w układach u ssaków.

Komórki **H295R** są ludzkimi komórkami raka nadnercza, które posiadają właściwości fizjologiczne strefowo niezróżnicowanych komórek nadnercza ludzkiego płodu i które wydzielają wszystkie enzymy szlaku steroidogenezy. Można je otrzymać z amerykańskiego zbioru typów kultur (ATCC).

Podłoże do zamrażania używane jest do zamrażania i przechowywania zamrożonych komórek. Podłoże to zawiera podłoże wyjściowe oraz BD NuSerum i sulfotlenek dimetylu.

Zakres liniowy oznacza zakres w ramach krzywej wzorcowej w odniesieniu do systemu do pomiaru hormonów, w którym wyniki są proporcjonalne do stężenia analitu obecnego w próbce.

LOQ oznacza granicę oznaczalności i stanowi najniższą ilość substancji chemicznej, jaką można odróżnić od braku tej substancji (wartość ślepej próby) przy określonej granicy ufności. Do celów omawianej metody granicę oznaczalności zazwyczaj definiuje producent systemów badań, jeżeli nie jest ona określona w inny sposób.

LOEC oznacza najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, czyli najniższe stężenie, przy którym reakcja w teście jest statystycznie różna w porównaniu z kontrolą rozpuszczalnika.

NOEC oznacza najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, czyli najwyższe badane stężenie, jeżeli test nie daje reakcji dodatniej.

Pasaż oznacza ilość podziałów komórek po inicjacji kultury z zamrożonego zapasu. Wstępnemu pasażowi, który przeprowadzono z zamrożonego zapasu, przypisuje się wartość jeden (1). Komórki, które zostały podzielone jednokrotnie, oznacza się jako pasaż 2 itd.

PBS oznacza roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami metodą Dulbecco.

Kontrola jakości, oznaczana skrótem QC, odnosi się do pomiarów niezbędnych do zapewnienia ważności danych.

Płytka kontroli jakości jest płytką 24-dołkową zawierającą dwa stężenia substancji kontroli dodatniej i ujemnej do celów monitorowania efektywności nowej partii komórek lub do celów zapewniania kontroli dodatniej na potrzeby testu podczas badania substancji chemicznych.

Próba jest niezależnym badaniem, w którym wykorzystuje się nowy zestaw roztworów i kontroli.

Podłoże wyjściowe stanowi podstawę do przygotowania innych odczynników. Podłoże to zawiera mieszaninę pożywki Dulbecco's zmodyfikowanego podłoża Eagle'a i podłoża odżywczego Hama F-12 w stosunku 1:1 w 15 mM bufora HEPES, niezawierającego czerwieni fenolowej ani wodorowęglanu sodu. Wodorowęglan sodu dodaje się jako bufor, zob. dodatek II do sprawozdania z walidacji (4).

Podłoże wzbogacone zawiera podłoże wyjściowe oraz BD Nu-Serum i najwyższej jakości mieszaninę ITS+, zob. dodatek II do sprawozdania z walidacji (4).

▼**M5**

Steroidogeneza jest syntetycznym szlakiem prowadzącym od cholesterolu do różnych hormonów sterydowych. Niektóre półprodukty na szlaku syntezy sterydów, takie jak progesteron i testosteron, same w sobie są ważnymi hormonami, ale odgrywają również rolę prekursorów dla hormonów powstających na dalszych etapach szlaku syntezy.

T oznacza testosteron, jeden z dwóch najważniejszych androgenów w układach ssaków.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

Płytka do badań jest płytką, na której komórki H295R poddawane są działaniu badanych substancji chemicznych. Płytki do badań zawierają kontrolę rozpuszczalnika i badaną substancję chemiczne w siedmiu poziomach stężenia po trzy płytki dla każdego stężenia.

Trypsyna 1X jest rozcieńczonym roztworem trypsyny, enzymu należącego do proteaz serynowych wytwarzanych przez trzustkę, stosowanym do oddzielania komórek od płytki do hodowli komórek, zob. dodatek III do sprawozdania z walidacji (4).

▼M5

B.58. **BADANIE MUTACJI GENOWEJ KOMÓREK SOMATYCZNYCH I GERMINALNYCH U GRYZONI TRANSGENICZNYCH**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest zgodna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 488 (2013 r.). W Unii Europejskiej dostępne są metody badawcze dla prowadzenia szerokiego zakresu badań mutacji *in vitro*, za pomocą których można wykryć mutacje chromosomowe lub genowe. Istnieją metody badawcze w odniesieniu do punktów końcowych *in vivo* (tj. aberracja chromosomowa i nieregularna synteza DNA). Za pomocą tych metod nie mierzy się jednak mutacji genowych. Badania mutacji u gryzoni transgenicznych spełniają zapotrzebowanie na praktyczne i powszechnie dostępne badania *in vivo* w kierunku mutacji genowych.

2. Badania mutacji u gryzoni transgenicznych zostały poddane szczegółowej analizie (24)(33). Badania te przeprowadza się na szczurach i myszach transgenicznych, które posiadają wiele kopii zintegrowanych w chromosomie wahadłowych wektorów fagowych lub plazmidowych. Transgeny zawierają geny reporterowe w celu wykrycia różnych rodzajów mutacji wywołanych *in vivo* przez badane substancje chemiczne.

3. Mutacje zachodzące u gryzonia ocenia się punktowo, odzyskując transgen i analizując fenotyp genu reporterowego u gospodarza bakteryjnego bez genu reporterowego. Za pomocą badań mutacji u gryzoni transgenicznych mierzy się mutacje wywołane w genetycznie neutralnych genach pozyskiwanych praktycznie z dowolnej tkanki gryzonia. Dzięki przedmiotowym badaniom pokonuje się zatem wiele istniejących ograniczeń związanych z badaniem mutacji genowej *in vivo* genów endogennych (np. ograniczona liczba tkanek nadających się do analizy, dodatnia/ujemna selekcja względem mutacji).

4. Z wagi dowodów wynika, że transgeny reagują na mutageny podobnie jak geny endogenne, szczególnie jeżeli chodzi o wykrywanie substytucji par zasad, mutacji związanych ze zmianą fazy odczytu, a także niewielkich delecji i insercji (24).

5. W ramach międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych (International Workshops on Genotoxicity Testing) zatwierdzono włączenie badań mutacji genowych u gryzoni transgenicznych w kierunku wykrycia mutacji genowych *in vivo*, a także zalecono protokół ich wdrożenia (15)(29). Opisywana metoda badawcza opiera się na wyżej wspomnianych zaleceniach. Dalszą analizę uzasadniającą stosowanie protokołu przedstawiono w (16).

6. Oczekuje się, że w przyszłości będzie możliwe łączenie badania mutacji genowych u gryzoni transgenicznych z badaniem toksyczności dawki powtórzonej (rozdział B.7 niniejszego załącznika). Potrzebne są jednak dane, aby mieć pewność, że czułość badania mutacji genowych u gryzoni transgenicznych nie jest zakłócona przez krótszy jednodniowy okres czasu między zakończeniem podawania i czasem pobierania próbek, co ma miejsce w badaniu toksyczności dawki powtórzonej, w porównaniu z 3-dniowym okresem w badaniach mutacji genowych u gryzoni transgenicznych. Niezbędne są również dane wskazujące, że zastosowanie szczepu gryzoni transgenicznych zamiast tradycyjnych szczepów gryzoni nie będzie miało negatywnego wpływu na efektywność badania toksyczności dawki powtórzonej. Przedmiotowa metoda badawcza zastanie zaktualizowania w momencie, w którym dostępne będą wyżej wskazane dane.

7. Definicje kluczowych terminów podano w dodatku.

▼**M5**

USTALENIA WSTĘPNE

8. Badania mutacji genowej u gryzoni transgenicznych, w odniesieniu do których dostępne są wystarczające dane na poparcie ich zastosowanie w opisywanej metodzie badawczej, to: myszy z wprowadzonym bakteriofagiem zawierającym gen *lacZ* (Muta™Mouse); mysz z plazmidem zawierającym gen *lacZ*; myszy i szczury *gpt* delta (*gpt* i Spi$^-$); myszy i szczury z wprowadzonym genem *lacI* (Big Blue®), wykonywane w warunkach standardowych. Ponadto do oceny mutacji w modelach Big Blue® i Muta™Mouse można stosować badanie selekcji dodatniej *cII*. Mutagenezę w modelach gryzoni transgenicznych zazwyczaj ocenia się jako częstość występowania mutacji; w razie potrzeby dodatkowe informacje można jednak uzyskać, dokonując analizy molekularnej mutacji (zob. pkt 24).

9. Takie badania mutacji genowej *in vivo* u gryzoni mają szczególne znaczenie w odniesieniu do oceny zagrożenia mutagennego, ponieważ reakcje uzyskane w badaniu zależą od metabolizmu *in vivo*, farmakokinetyki, procesów naprawy DNA, oraz awaryjnego mechanzmu syntezy DNA, chociaż mogą one różnić się od siebie w zależności od gatunku, tkanek oraz rodzajów uszkodzenia DNA. Badanie *in vivo* w kierunku mutacji genowych jest również użyteczne w odniesieniu do dalszych badań skutków mutagennych wykrytych w systemie *in vitro* oraz do dalszych działań w związku z wynikami badań z wykorzystaniem innych punktów końcowych w badaniu *in vivo* (24). Oprócz związku przyczynowego z wywoływaniem nowotworów mutacja genowa stanowi istotny punkt końcowy przy przewidywaniu nienowotworowych chorób powstałych wskutek mutacji w tkankach somatycznych (12)(13) oraz chorób przekazywanych w linii germinalnej.

10. Przeprowadzenie badania mutacji genowej u gryzoni transgenicznych nie jest właściwe, jeżeli istnieją dowody, że badana substancja chemiczna, lub istotny metabolit, nie dotrze do badanych tkanek.

ZASADA BADANIA

11. W badaniach opisanych w pkt 8 gen docelowy jest pochodzenia bakteryjnego lub bakteriofagowego, a odzyskanie z genomowego DNA gryzonia polega na wprowadzeniu transgenu do wahadłowego wektora fagowego lub plazmidowego λ. Procedura obejmuje ekstrakcję genomowego DNA z badanej tkanki gryzonia, przetworzenie *in vitro* genomowego DNA (tj. pakowanie wektorów λ lub ligacja i elektroporacja plazmidów w celu odzyskania wektora wahadłowego), a następnie wykrycie mutacji u gospodarzy bakteryjnych w odpowiednich warunkach. W badaniu stosuje się transgeny neutralne, które łatwo odzyskać z większości tkanek.

12. Podstawowe doświadczenie z zakresu mutacji genowej u gryzoni transgenicznych polega na podawaniu gryzoniowi substancji chemicznej przez określony czas. Substancje chemiczne można podawać każdą odpowiednią drogą, w tym poprzez implantację (np. badanie wyrobów medycznych). Łączny okres podawania dawki zwierzęciu jest zwany okresem podawania. Po podaniu następuje zazwyczaj okres poprzedzający uśmiercenie, podczas którego nie podaje się substancji chemicznej, a nienaprawione uszkodzenia DNA zostają utrwalone w postaci stabilnych mutacji. W literaturze okres ten występuje pod różnymi nazwami, tj. czasu manifestacji, czasu utrwalenia lub czasu ekspresji; okres ten kończy się pobraniem próbek (15)(29). Po uśmierceniu zwierzęcia genomowe DNA zostaje wyizolowane z badanej tkanki lub tkanek i oczyszczone.

▼M5

13. Dane dotyczące pojedynczej tkanki każdego zwierzęcia z wielu pakietów/ligacji są zazwyczaj zagregowane, a częstość występowania mutacji zazwyczaj ocenia się, stosując łącznie 10^5–10^8 jednostek tworzących łysinki lub jednostek tworzących kolonię. Stosując metodę selekcji dodatniej, całkowitą liczbę jednostek tworzących łysinki określa się za pomocą oddzielnego zestawu płytek z podłożem nieselektywnym.

14. Opracowano metody selekcji dodatniej, aby ułatwić wykrywanie mutacji zarówno w genie *gpt* [mysz i szczur *gpt* delta, fenotyp *gpt*$^-$ (20)(22)(28)], jak i genie *lacZ* [Muta™Mouse lub mysz z plazmidem zawierającym gen *lacZ* (3)(10)(11)(30)]. Natomiast mutacje genu *lacI* u zwierząt Big Blue® są wykrywane metodą nieselektywną, za pomocą której mutacje identyfikuje się dzięki tworzeniu zabarwionych (na niebiesko) łysinek. Metodę selekcji dodatniej stosuje się również do wykrywania mutacji punktowych powstających w genie *cII* wahadłowego wektora bakteriofaga λ [mysz lub szczur Big Blue® oraz Muta™Mouse (17)] oraz delecji w genach λ *red* i *gam* [selekcja Spi $^-$ u myszy i szczura *gpt* delta (21)(22)(28)]. Częstość występowania mutacji oblicza się, dzieląc liczbę łysinek/plazmidów zawierających mutacje w transgenie przez całkowitą liczbę łysinek/plazmidów uzyskanych z tej samej próbki DNA. W badaniach mutacji genowej u gryzoni transgenicznych zgłaszanym parametrem jest częstość występowania mutacji. Ponadto częstość występowania mutacji można określać jako frakcję komórek, w których zachodzą niezależne mutacje. Wykonanie tego obliczenia wymaga korekty o ekspansję klonalną w drodze sekwencjonowania pod kątem uzyskanych mutacji (24).

15. Mutacje zliczane w badaniach mutacji punktowej genów *lacI, lacZ, cII* i *gpt* obejmują głównie substytucje par zasad, mutacje spowodowane zmianami fazy odczytu oraz niewielkie insercje/delecje. Względny udział tych rodzajów mutacji wśród mutacji spontanicznych przypomina mutacje obserwowane w przypadku genu endogennego *Hprt*. Duże delecje wykrywa się wyłącznie stosując selekcję Spi $^-$ oraz badanie przy użyciu plazmidów zawierających gen *lacZ* (24). Badanymi mutacjami są mutacje *in vivo* powstające u myszy lub szczura. Mutacje w badaniach *in vitro* i *ex vivo,* które mogą powstawać podczas uzyskiwania fagów/plazmidów, replikacji lub naprawy, występują stosunkowo rzadko, a w niektórych systemach można je wyraźnie zidentyfikować lub wykluczyć za pomocą systemu gospodarza bakteryjnego/selekcji dodatniej.

OPIS METODY BADAWCZEJ

Przygotowania

Wybór gatunków zwierząt

16. Obecnie dostępne są liczne modele wykrywania mutacji genowej u myszy transgenicznych, które to systemy są powszechniej stosowane niż modele szczurów transgenicznych. Jeżeli szczur jest zdecydowanie bardziej odpowiednim modelem niż mysz (np. w badaniu mechanizmu karcynogenezy dla guzów obserwowanych jedynie u szczurów; do celów korelacji z badaniem toksyczności u szczurów; lub jeżeli wiadomo, że metabolizm u szczurów jest bardziej reprezentatywny dla metabolizmu u ludzi), należy rozważyć wykorzystanie modeli szczurów transgenicznych.

Warunki trzymania i żywienia

17. Temperatura w pomieszczeniu ze zwierzętami doświadczalnymi powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu dziennym 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do

▼M5

wody pitnej. Wybór paszy może zależeć od potrzeby zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej przy podawaniu jej tą drogą. Zwierzęta należy trzymać w małych grupach (nie więcej niż pięć zwierząt) tej samej płci, jeżeli nie oczekuje się agresywnego zachowania. Jeżeli ma to naukowe uzasadnienie, zwierzęta mogą być trzymane oddzielnie.

Przygotowanie zwierząt

18. Zdrowe, młode, dojrzałe płciowo dorosłe zwierzęta (w wieku 8–12 tygodni na początku badania) są losowo przydzielane do grup kontrolnych i badanych. Zwierzęta są identyfikowane jednoznacznie. Zwierzęta są aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych co najmniej przez pięć dni. Klatki powinny być ustawione w taki sposób, żeby zminimalizować możliwy wpływ położenia klatki. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała zwierząt powinny być minimalne oraz nie powinny przekraczać ± 20 % średniej masy dla każdej płci.

Przygotowanie dawek

19. Stałe badane substancje chemiczne powinny zostać rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach lub domieszane do paszy lub wody pitnej przed podaniem dawki zwierzętom. Płynne badane substancje chemiczne mogą być dawkowane bezpośrednio lub mogą zostać rozcieńczone przed dawkowaniem. W przypadku inhalacji badane substancje chemiczne można podawać w postaci gazu, pary lub stałych/ciekłych aerozoli, w zależności od ich właściwości fizyczno-chemicznych. Powinny zostać wykorzystane świeże preparaty badanej substancji chemicznej, chyba że dane dotyczące stabilności wykazują dopuszczalność składowania.

Warunki badawcze

Rozpuszczalnik/nośnik

20. Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien wywoływać skutków toksycznych przy wykorzystywanych objętościach dawki oraz nie powinien reagować chemicznie z badaną substancją chemiczną. Jeśli inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki są wykorzystywane, ich włączenie do badania powinno być poparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników.

Kontrole dodatnie

21. Na ogół należy prowadzić równoległą grupę zwierząt na potrzeby kontrolni dodatniej. W przypadku laboratoriów, które wykazały kompetencje (zob. pkt 23) i które regularnie wykonują przedmiotowe badania, do każdego badania można jednak włączyć DNA zwierząt stanowiących wcześniejszą kontrolę dodatnią, aby potwierdzić sukces metody. Takie DNA pochodzące z wcześniejszych doświadczeń należy uzyskać od tego samego gatunku oraz z tej samej badanej tkanki i odpowiednio przechowywać (zob. pkt 36). Prowadząc równoległą kontrolę dodatnią, nie trzeba stosować tej samej drogi podawania, co w przypadku grupy badanej substancji chemicznej. Musi być jednak wiadomo, że kontrole dodatnie wywołują mutacje w co najmniej jednej badanej tkance w odniesieniu do grupy badanej substancji chemicznej. Dawki substancji chemicznych na potrzeby kontroli dodatnich należy dobierać tak, aby dawały słabe lub umiarkowane efekty, które umożliwiają krytyczną ocenę efektywności i czułości badania. W tabeli 1 przedstawiono przykładowe substancje stosowane do kontroli dodatnich i niektóre ich tkanki docelowe.

▼M5

Tabela 1

Przykładowe substancje na potrzeby kontroli dodatnich i niektóre ich tkanki docelowe

Substancje chemiczne na potrzeby kontroli dodatnich i nr CAS	Nazwa EINECS i nr EINECS	Właściwości	Docelowa tkanka, w której ma dojść do mutacji	
			Szczur	Mysz
N-etylo-N-nitrozomocznik [Nr CAS 759-73-9]	N-etylo-N-nitrozomocznik [212-072-2]	Mutagen o działaniu bezpośrednim	Wątroba, płuco	Szpik kostny, okrężnica, nabłonek okrężnicy, jelito, wątroba, płuco, śledziona, nerka, komórki ziarniste jajników, męskie komórki germinalne
Karbaminian etylu (uretan) [Nr CAS 51-79-6]	Uretan [200-123-1]	Mutagen, wymaga metabolizmu, jednak daje jedynie słabe efekty		Szpik kostny, przedżołądek, jelito cienkie, wątroba, płuco, śledziona
2,4-diaminotoluen [nr CAS 95-80-7]	4-metylo-m-fenylenodiamina [202-453-1]	Mutagen, wymaga metabolizmu, dodatni również w badaniu Spi^-	Wątroba	Wątroba
Benzo[a]piren [nr CAS 50-32-8]	Benzo[def]chryzen [200-028-5]	Mutagen, wymaga metabolizmu	Wątroba, sieć	Szpik kostny, pierś, okrężnica, przedżołądek, żołądek gruczołowy, serce, wątroba, płuco, męskie komórki germinalne

Kontrole ujemne

22. Ujemne kontrole, poddane działaniu samego rozpuszczalnika lub nośnika, a poza tym traktowane w ten sam sposób co grupy poddane działaniu substancji, powinny zostać uwzględnione w każdym pobieraniu próbek. Jeżeli nie istnieją historyczne lub opublikowane dane wykazujące, że wybrany rozpuszczalnik/nośnik nie wywołuje żadnych szkodliwych lub mutagennych skutków, grupy kontrolne niepoddane działaniu substancji powinny zostać również uwzględnione w każdym okresie pobierania próbek w celu ustalenia dopuszczalności grupy kontrolnej nośnika.

Weryfikacja biegłości laboratorium

23. Kompetencje w zakresie przedmiotowych badań ustala się, wykazując zdolność do odtworzenia oczekiwanych wyników z opublikowanych danych (24) dla: 1) częstości występowania mutacji przy zastosowaniu substancji chemicznych jako kontroli dodatnich (w tym reakcje słabe), takich jak te wymienione w tabeli 1, substancji innych niż mutageny oraz grup kontrolnych nośnika; oraz 2) odzyskania transgenu z genomowego DNA (np. wydajność pakowania).

Sekwencjonowanie mutacji

24. W przypadku zastosowań normatywnych sekwencjonowanie DNA mutacji nie jest wymagane, szczególnie w przypadku uzyskania wyraźnego wyniku dodatniego lub ujemnego. Dane sekwencjonowania mogą jednak być przydatne, jeżeli odnotowuje się duże zróżnicowanie indywidualne. W takich przypadkach można zastosować sekwencjonowanie w celu wykluczenia możliwości wystąpienia kumulacji (ang. jackpots) lub klonowania poprzez

▼M5

identyfikację odsetka unikalnych mutacji w określonej tkance. Sekwencjonowanie około 10 mutacji na tkankę na zwierzę powinno wystarczyć do prostego określenia, czy mutacje klonalne wpływają na częstość występowania mutacji. Wysekwencjonowanie aż 25 mutacji może być niezbędne do dokonania matematycznej korekty częstości występowania mutacji pod kątem klonalności. Sekwencjonowania mutacji można również rozważyć w przypadku wykrycia niewielkich wzrostów częstości występowania mutacji (tj. wartości nieco przewyższających wartości uzyskane w grupie kontrolnej niepoddanej działaniu substancji). Różnice w spektrum mutacji między hodowlami zmutowanych komórek zwierząt poddanych działaniu substancji i zwierząt niepoddanych działaniu substancji mogą potwierdzać skutki mutagenne (29). Ponadto spektra mutacji mogą być przydatne przy formułowaniu hipotez mechanistycznych. Jeżeli sekwencjonowanie ma zostać uwzględnione w protokole badania, należy zachować szczególną uwagę przy tworzeniu projektu takich badań, w szczególności w odniesieniu do liczby zmutowanych komórek podczas sekwencjonowania jednej próbki, aby uzyskać odpowiednią moc zgodnie z zastosowanym modelem statystycznym (zob. pkt 43).

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

25. Należy wcześniej ustalić całkowitą liczbę zwierząt w grupie tak, aby była wystarczająca do uzyskania statystycznej mocy testu niezbędnej do wykrycia co najmniej podwojenia częstości występowania mutacji. Grupa powinna składać się z co najmniej pięciu zwierząt. Jeżeli jednak moc testu jest niewystarczająca, należy odpowiednio zwiększyć liczbę zwierząt. Zasadniczo należy wykorzystywać samce zwierząt. Może zdarzyć się, że badania samych samic byłoby uzasadnione, przykładowo w przypadku testowania leków dla ludzi przeznaczonych dla kobiet lub badania metabolizmu kobiet. Jeżeli zachodzą znaczne różnice między płciami pod względem toksyczności lub metabolizmu, należy wykorzystać zarówno samce, jak i samice.

Okres podawania

26. Na podstawie obserwacji, zgodnie z którymi z każdym poddawaniem działaniu substancji zachodzi akumulacja mutacji, niezbędny jest schemat powtarzanego dawkowania, obejmujący podawanie substancji badanej codziennie przez okres 28 dni. Powszechnie uznaje się to za dopuszczalne zarówno pod względem uzyskania wystarczającej akumulacji mutacji wywołanych słabymi mutagenami, jak i pod względem uzyskania czasu ekspozycji odpowiedniego do wykrycia mutacji w narządach, których proliferacja tkanek zachodzi powoli. W przypadku niektórych ocen odpowiednie może być zastosowanie alternatywnych schematów podawania substancji, które należy naukowo uzasadnić w protokole. Poddawanie działaniu substancji nie powinno trwać krócej niż czas wymagany do całkowitego indukowania wszystkich odpowiednich enzymów metabolicznych. Poddawanie działaniu substancji przez krótszy czas może wymagać zastosowania wielokrotnego pobierania próbek, odpowiedniego dla narządów o różnym tempie proliferacji tkanek. W każdym przypadku, uzasadniając protokół, należy przestawić wszystkie dostępne informacje (np. dotyczące toksyczności ogólnej lub metabolizmu i farmakokinetyki), szczególnie w przypadku odejścia od powyższych standardowych zaleceń. Czas poddawania działaniu substancji dłuższy niż 8 tygodni należy dokładnie wyjaśnić i uzasadnić, ponieważ może to również powodować wyraźny wzrost częstości występowania mutacji w drodze ekspansji klonalnej (29), chociaż może zwiększyć czułość badania.

Poziomy dawek

27. Poziomy dawek powinny opierać się na wynikach badania służącego wyznaczeniu zakresów dawki, w ramach którego dokonuje się pomiaru ogólnej toksyczności, przeprowadzonego tą samą drogą ekspozycji, lub na wynikach wcześniej istniejących badań toksyczności podostrej. Do wyznaczenia zakresów dawki można wykorzystać zwierzęta nietransgeniczne należące do tego samego szczepu gryzoni. W ramach głównego badania, w celu

▼M5

uzyskania informacji dotyczących zależności dawka-odpowiedź, całkowite badanie powinno obejmować kontrolę ujemną (zob. pkt 22) i co najmniej trzy poziomy dawek podawanych w odpowiednich odstępach, z wyjątkiem przypadków zastosowania dawki granicznej (zob. pkt 28). Najwyższą dawką powinna być najwyższa tolerowana dawka. Najwyższa tolerowana dawka jest określona jako dawka wywołująca oznaki toksyczności, przy czym oczekuje się, że wyższe poziomy dawek oparte na tym samym schemacie dawkowania mogłyby być śmiertelne. Substancje chemiczne o szczególnej aktywności biologicznej przy niskich nietoksycznych dawkach (takie jak hormony i mitogeny) oraz substancje chemiczne wykazujące intensywne właściwości toksykologiczne mogą stanowić wyjątek w odniesieniu do kryteriów ustalania dawki i powinny być oceniane odrębnie dla każdego przypadku. Poziomy dawek powinny objąć zakres od maksymalnej do niskiej toksyczności lub do jej braku.

Badanie graniczne

28. Jeżeli badania służące wyznaczeniu zakresów dawki lub istniejące dane dotyczące pokrewnych szczepów gryzoni wskazują, że schemat dawkowania dla co najmniej dawki granicznej (zob. poniżej) nie daje obserwowalnych efektów toksycznych oraz jeżeli nie podejrzewa się genotoksyczności w oparciu o dane dotyczące substancji chemicznych powiązanych strukturalnie, wówczas przeprowadzenie pełnego badania z zastosowaniem trzech poziomów dawek może nie być konieczne. W przypadku okresu podawania wynoszącego 28 dni (tj. 28 dni poddawania działaniu substancji) dawka graniczna wynosi 1 000 mg/kg masy ciała/dobę. W przypadku okresów podawania wynoszących nie więcej niż 14 dni, dawka graniczna wynosi 2 000 mg/kg masy ciała/dobę (schematy dawkowania inne niż 28 dni poddawania działaniu substancji należy naukowo uzasadnić w protokole; zob. pkt 26).

Podawanie dawek

29. Badana substancja chemiczna jest zazwyczaj podawana przez sondę przy użyciu sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Zasadniczo, opracowując badanie, należy rozważyć przewidywaną drogę narażenia ludzi. Dlatego też możliwe jest dopuszczenie innych dróg narażenia (takich jak podawanie w wodzie pitnej, podawanie podskórne, dożylne, miejscowe, inhalacja, podawanie dotrztchawiczne, podawanie w paszy lub implantacja), jeżeli można to uzasadnić. Nie zaleca się stosowania wstrzyknięcia dootrzewnowego, ponieważ z fizjologicznego punktu widzenia nie jest to droga narażenia ludzi. Maksymalna objętość płynu, jaka może być podana przez sondę lub wstrzyknięta jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość nie powinna przekraczać 2 ml/100 g masy ciała. Wykorzystanie objętości wyższych niż podane musi być uzasadnione. Poza drażniącymi i żrącymi substancjami chemicznymi, które zwykle dają zaostrzone objawy przy wyższych stężeniach, zmienność objętości w badaniu powinna być zminimalizowana przez dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość przy wszystkich poziomach dawki.

Czas pobierania próbek

Komórki somatyczne

30. Czas pobierania próbek stanowi kluczową zmienną, ponieważ ustala się go na podstawie okresu potrzebnego do utrwalenia mutacji. Okres ten zależy od tkanki i wydaje się związany z czasem odnowy populacji komórek, przy czym szpik kostny i jelito reagują szybko, a wątroba znacznie wolniej. Odpowiedni kompromis w odniesieniu do pomiaru częstości występowania mutacji zarówno w tkankach o szybkiej proliferacji, jak i w tkankach o wolnej proliferacji to 28 kolejnych dni poddawania działaniu substancji (jak wskazano w pkt 26) oraz pobieranie próbek w trzy dni po ostatnim podaniu, chociaż w tych warunkach może nie dojść do maksymalnej częstości występowania mutacji w tkankach o wolnej proliferacji. Jeżeli tkanki o wolnej proliferacji mają szczególne znaczenie, odpowiedniejsze może być zastosowanie późniejszego czasu pobierania próbek wynoszącego 28 dni po okresie podawania wynoszącym 28 dni (16)(29). W takich przypadkach zamiast czasu pobierania próbek w 3 dniu po okresie podawania zastosowano by późniejszy czas pobierania próbek, który wymagałby naukowego uzasadnienia.

▼M5

Komórki germinalne

31. Testy na gryzoniach transgenicznych są odpowiednie do badania indukcji mutacji genowej w męskich komórkach germinalnych (7)(8)(27), w przypadku których wyraźnie określono czas i kinetykę spermatogenezy (27). Mała liczba komórek jajowych dostępnych do analizy, nawet po superowulacji, oraz brak syntezy DNA w oocycie wykluczają określenie mutacji w żeńskich komórkach germinalnych z zastosowaniem badań na zwierzętach transgenicznych (31).

32. Wyboru momentów pobierania próbek dla męskich komórek germinalnych dokonuje się w taki sposób, aby pobrać próbki szeregu rodzajów komórek poddanych narażeniu w całym procesie rozwoju komórki germinalnej oraz tak, aby na docelowym etapie pobierania próbek narażenie było wystarczające. Czas potrzebny na rozwój komórek germinalnych ze spermatogoniów do postaci dojrzałych plemników docierających do nasieniowodu/ogonów najądrzy wynosi ~ 49 dni dla myszy (36) oraz ~ 70 dni dla szczurów (34)(35). Po 28-dniowym okresie narażenia, a następnie 3-dniowym okresie pobierania próbek zakumulowane plemniki pobrane z nasieniowodu/ogonów najądrzy (7)(8) stanowią populację komórek poddanych narażeniu w przybliżeniu w drugiej połowie spermatogenezy, w tym na etapie mejotycznym i postmejotycznym, lecz nie na etapie spermatogonium lub komórki macierzystej. Aby w odpowiedni sposób pobrać próbki komórek znajdujących się w nasieniowodzie/ogonach najądrzy, które w okresie narażenia były spermatogoniami, należy dodatkowo pobrać próbki po upływie co najmniej 7 tygodni (myszy) lub 10 tygodni (szczury) od zakończenia poddawania działaniu substancji.

33. Komórki uzyskane z cewek nasiennych po okresie 28 + 3 dni stanowią populację mieszaną, obejmującą wszystkie etapy rozwoju komórek germinalnych (7)(8). Pobieranie próbek tych komórek w celu wykrycia mutacji genowych nie zapewnia tak dokładnej oceny etapów, na których doszło do indukowania mutacji komórek germinalnych, jaką można uzyskać, pobierając próbki plemników z nasieniowodu/ogonów najądrzy (ponieważ próbki pobierane z cewek zawierają szereg rodzajów komórek germinalnych i dochodzi do skażenia przedmiotowej populacji komórek niektórymi komórkami somatycznymi). Pobranie próbek komórek z cewek nasiennych oprócz pobrania próbek plemników z nasieniowodu/ogonów najądrzy zgodnie ze schematem pobierania próbek 28 + 3 dni zagwarantowałoby jednak, że w skład pobranych komórek wchodziłyby komórki poddane narażeniu na większości etapów rozwoju komórki germinalnej, co może być przydane do wykrywania mutagenów komórek germinalnych.

Obserwacje

34. Ogólne obserwacje kliniczne powinny być przeprowadzane co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze, biorąc pod uwagę szczytowy okres przewidywanych objawów po dawkowaniu. Stan zdrowia zwierząt powinien być odnotowywany. Co najmniej dwa razy dziennie wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane pod kątem zachorowalności i śmiertelności. Wszystkie zwierzęta powinny być ważone co najmniej raz w tygodniu oraz przed uśmierceniem. Pomiary spożycia paszy powinny być dokonywane przynajmniej co tydzień. Jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie pitnej, spożycie wody musi być także mierzone przy każdej zmianie wody i przynajmniej cotygodniowo. Zwierzęta wykazujące oznaki nadmiernej toksyczności nieprowadzące do śmierci należy poddać eutanazji przed zakończeniem badania (23).

▼M5

Pobieranie tkanek

35. Należy wyraźnie określić podstawy pobrania tkanek. Ponieważ praktycznie każdą tkankę można poddać badaniu pod kątek indukowania mutacji, wybór tkanek, które zostaną pobrane, powinien być uwarunkowany przyczyną przeprowadzania badania oraz wszelkimi istniejącymi danymi dotyczących badanej substancji chemicznej w zakresie mutagenności, rakotwórczości lub toksyczności. Do istotnych czynników, które należy rozważyć, należy drogę podania (w oparciu o prawdopodobną drogę lub drogi narażenia ludzi), przewidywana dystrybucja w tkankach oraz ewentualny mechanizm działania. W przypadku braku informacji ogólnych należy pobrać szereg tkanek somatycznych, które przypuszczalnie są istotne. Tkanki te powinny obejmować tkanki szybko proliferujące, tkanki wolno proliferujące i tkanki w miejscu kontaktu. Ponadto należy pobrać i przechowywać plemniki z nasieniowodu/ogonów najądrzy oraz rozwijające się komórki germinalne z cewek nasiennych (zgodnie z opisem zawartym w pkt 32 i 33) na wypadek konieczności przeprowadzenia w przyszłości analizy mutagenności komórek germinalnych. Należy uzyskać masy narządów, a w przypadku dużych narządów od wszystkich zwierząt należy je pobrać ten sam obszar.

Przechowywanie tkanek i DNA

36. Tkanki (lub homogenaty tkanek) należy przechowywać w temperaturze –70 °C lub niższej i wykorzystać w celu izolacji DNA w ciągu 5 lat. Wyizolowane DNA przechowywane schłodzone w temperaturze 4 °C we właściwym buforze należy najlepiej wykorzystać do analizy mutacji w przeciągu 1 roku.

Wybór tkanek do analizy mutacji

37. Wyboru tkanek należy dokonywać, uwzględniając takie kwestie jak: 1) droga podania lub miejsce pierwszego kontaktu (np. żołądek gruczołowy przy podaniu drogą pokarmową, płuco przy podaniu przez inhalację lub skóra przy podaniu miejscowym); oraz 2) parametry farmakokinetyczne odnotowane w ogólnych badaniach toksyczności, wskazujące rozmieszczenie, zatrzymanie lub akumulację w tkankach, lub narządy docelowe pod kątem toksyczności. W przypadku prowadzenia badań uzupełniających badania rakotwórczości należy rozważyć docelowe tkanki pod kątem rakotwórczości. Tkanki do analizy należy tak dobierać, aby zmaksymalizować wykrycie substancji chemicznych będących mutagenami działającymi bezpośrednio w badaniu *in vitro*, charakteryzujących się szybkim metabolizmem, dużą reaktywnością i słabą absorpcją, lub substancji chemicznych, w odniesieniu do których tkankę docelową określa się na podstawie drogi podania (6).

38. W przypadku braku informacji ogólnych i uwzględniając miejsce kontaktu wynikające z drogi podania, ocenie w kierunku mutagenności należy poddać wątrobę i co najmniej jedną tkankę ulegającą szybkiemu podziałowi (np. żołądek gruczołowy, szpik kostny). W większości przypadków powyższe wymogi można spełnić, przeprowadzając analizę dwóch starannie dobranych tkanek, jednak w niektórych przypadkach konieczne byłoby zastosowanie co najmniej trzech tkanek. Jeżeli istnieją powody szczególnych obaw w odniesieniu do skutków dla komórek germinalnych, w tym dodatnich wyników w komórkach somatycznych, należy zbadać tkanki zawierające komórki germinalne pod kątem mutacji.

Metody pomiaru

39. Dostępne są standardowe metody laboratoryjne lub opublikowane metody wykrywania mutacji dla zalecanych modeli transgenicznych: bakteriofag lambda i plazmid zawierające gen *lacZ* (30); mysz z wprowadzonym genem *lacI* (2)(18); mysz *gpt* delta (22); szczur *gpt* delta (28); *cII* (17). Zmiany należy uzasadnić i odpowiednio udokumentować. Dane dotyczące wielu reakcji pakowania można zagregować i wykorzystać do osiągnięcia odpowiedniej liczby łysinek lub kolonii. Konieczność zastosowania dużej liczby reakcji pakowania w celu osiągnięcia odpowiedniej liczby łysinek może jednak wskazywać na niską jakość DNA. W takich przypadkach, rozważając dane, należy zachować ostrożność, ponieważ mogą być one

▼M5

niewiarygodne. Optymalna całkowita liczba łysinek lub kolonii przypadająca na próbkę DNA zależy od statystycznego prawdopodobieństwa wykrycia wystarczającej liczby mutacji przy danej częstości występowania mutacji spontanicznych. Zasadniczo przy częstości występowania mutacji spontanicznych rzędu 3×10^{-5} minimalna wymagana liczba łysinek wynosi 125 000–300 000 (15). W przypadku badania Big Blue® *lacI* ważne jest, aby wykazać, że cały zakres zabarwionych fenotypów mutacji można wykryć, wprowadzając odpowiednie kontrole barwienia równolegle do każdego testu płytkowego. Tkanki i ich próbki (pozycje) należy przetworzyć i przeanalizować, stosując projekt blokowy, w którym pozycje z grupy kontrolnej nośnika/rozpuszczalnika, grupy kontroli dodatniej (jeżeli ją zastosowano) lub kontroli dodatniej DNA (w stosownych przypadkach) oraz wszystkich grup poddanych działaniu substancji są przetwarzane łącznie.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

40. Dane dotyczące poszczególnych zwierząt powinny zostać przedstawione w formie tabelarycznej. Jednostką doświadczalną jest zwierzę. W sprawozdaniu należy uwzględnić łączną liczbę jednostek tworzących łysinki (pfu) lub jednostek tworzących kolonię (cfu), liczbę mutacji i częstość występowania mutacji w odniesieniu do każdej tkanki każdego zwierzęcia. Jeżeli istnieje wiele reakcji pakowania/izolacji, należy odnotować liczbę reakcji przypadającą na próbkę DNA. Chociaż należy zachować dane dotyczące poszczególnych reakcji, odnotować należy jedynie łączną liczbę pfu lub cfu. Należy zgłosić dane dotyczące toksyczności i objawów klinicznych, jak wskazano w pkt 34. Wszelkie wyniki sekwencjonowania należy przedstawiać dla każdej przeanalizowanej mutacji i należy przedstawić wynikłe obliczenia częstości występowania mutacji dla każdego zwierzęcia i dla każdej tkanki.

Ocena statystyczna i interpretacja wyników

41. Istnieją liczne kryteria oznaczania wyników dodatnich, takie jak związany z dawką wzrost częstości występowania mutacji lub wyraźny wzrost częstości występowania mutacji w grupie pojedynczej dawki w porównaniu do grupy kontrolnej rozpuszczalnika/nośnika. Aby uzyskać wystarczające dane do analizy zależności dawka-odpowiedź, należy przeanalizować co najmniej trzy poddane działaniu substancji grupy dawkowania. Chociaż biologiczne znaczenie wyników powinno zostać wzięte pod uwagę w pierwszej kolejności, można wykorzystać odpowiednie metody statystyczne jako metody pomocnicze w przeprowadzaniu oceny wyników (4)(14)(15)(25)(26). Jednostką doświadczalną w zastosowanych badaniach statystycznych powinno być zwierzę.

42. Badana substancja chemiczna, w odniesieniu do której wyniki nie spełniają powyższych kryteriów, uważana jest za niemutagenną w opisywanym badaniu. W przypadku biologicznego znaczenia wyników ujemnych należy potwierdzić narażenie tkanki.

43. W przypadku analiz sekwencjonowania DNA dostępnych jest wiele metod statystycznych jako metod pomocniczych w interpretacji wyników (1)(5)(9)(19).

44. Uwzględnienie, czy zaobserwowane wartości są w obrębie historycznych zakresów kontroli, czy też poza nimi, może stanowić wskazówkę przy ocenie biologicznego znaczenia reakcji (32).

▼M5

Sprawozdanie z badania

45. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— dane identyfikacyjne i numer CAS, jeżeli jest znany,

— źródło, numer partii, jeżeli jest dostępny,

— cechy fizyczne i czystość,

— właściwości fizyko-chemiczne stosownie do warunków przeprowadzania badania,

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana.

Rozpuszczalnik/nośnik:

— uzasadnienie wyboru nośnika,

— rozpuszczalność oraz stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku,

— przygotowanie postaci użytkowych paszy, wody pitnej i inhalacji,

— analityczne określenie postaci użytkowych (np. stabilność, homogeniczność, stężenia nominalne).

Badane zwierzęta:

— wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie ich wyboru,

— liczba, wiek i płeć zwierząt,

— źródło, warunki przebywania, pasza itp.,

— masa poszczególnych zwierzęcia na początku badania, łącznie z zakresem mas ciała, średnimi oraz standardowymi odchyleniami dla każdej grupy.

Warunki badania:

— dane dotyczące dodatnich i ujemnych (rozpuszczalnik/nośnik) kontroli,

— dane z badania ustalania zakresu,

— uzasadnienie w odniesieniu do wyboru poziomu dawki,

— szczegóły dotyczące preparatów badanej substancji chemicznej,

— szczegóły dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,

— racjonalne uzasadnienie w odniesieniu do drogi podawania,

— metody pomiaru toksyczności u zwierząt, w tym dostępne badania histopatologiczne lub hematologiczne oraz częstotliwość przeprowadzania obserwacji zwierząt i pomiaru masy ciała,

— metody sprawdzania, czy badana substancja chemiczna dotarła do tkanki docelowej lub do krwiobiegu w przypadku otrzymania wyników ujemnych,

▼M5

— dawka faktyczna (mg/kg masy ciała/dzień) obliczona w oparciu o stężenie badanej substancji chemicznej w paszy/wodzie pitnej (ppm) i spożycia, w stosownych przypadkach,

— szczegóły dotyczące jakości pożywienia i wody,

— szczegółowy opis harmonogramów poddawania działaniu substancji oraz pobierania próbek,

— metody eutanazji,

— procedury izolowania i konserwacji tkanek,

— metody izolacji genomowego DNA gryzoni, odzyskanie transgenu z genomowego DNA oraz przenoszenia transgenicznego DNA do gospodarza bakteryjnego,

— źródło i numery partii wszystkich komórek, zestawów i odczynników (w stosownych przypadkach),

— metody oznaczania liczby mutacji,

— metody molekularnej analizy mutacji i zastosowanie ich przy dokonywaniu korekcji o klonalność lub obliczaniu częstości występowania mutacji, w stosownych przypadkach.

Wyniki:

— stan zwierząt przed badaniem i podczas całego okresu badania, w tym oznaki toksyczności,

— masa ciała i narządów w chwili uśmiercenia,

— w odniesieniu do każdej tkanki/każdego zwierzęcia liczba badanych mutacji, liczba łysinek lub kolonii, częstotliwość występowania mutacji,

— dla każdej grupy tkanek/zwierząt, liczba reakcji pakowania dla próbki DNA, łączna liczba mutacji, średnia częstość występowania mutacji, odchylenie standardowe,

— zależność dawka-odpowiedź, w miarę możliwości,

— w odniesieniu do każdej tkanki/każdego zwierzęcia liczba niezależnych mutacji i średnia częstość występowania mutacji w przypadku przeprowadzenia molekularnej analizy mutacji,

— dane dotyczące równolegle prowadzonej i historycznej kontroli ujemnej z uwzględnieniem zakresów, średnich i odchyleń standardowych,

— dane dotyczące jednoczesnej kontroli dodatniej (lub niejednoczesnych kontroli dodatnich DNA),

— oznaczenia analityczne, jeżeli jest dostępne (np. stężenia DNA zastosowane w pakowaniu, dane z sekwencjonowania DNA),

— zastosowane analizy i metody statystyczne.

Omówienie wyników

Wnioski

▼**M5**

LITERATURA

(1) *Adams,* W.T. i T.R. *Skopek* (1987 r.), 'Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol*., 194: 391-396.

(2) Bielas, J.H. (2002 r.), '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 i J. Vijg (1995 r.), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations', *Nature*, 377(6550): 657–659

(4) Carr, G.J. i N.J. Gorelick (1995 r.), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

(5) Carr, G.J. i N.J. Gorelick (1996 r.), '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 i V. Thybaud (1999 r.), '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 i L.M. Soper(1995 r.), '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 i J. Jiao (1997 r.), '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. i K.R. Tindall (2000 r.), '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 id J. Vijg(1989 r.), '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. i J. Vijg (1993 r.), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

(12) Erikson, R.P. (2003 r.), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543: 125–136.

(13) Erikson, R.P. (2010 r.), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, 705: 96–106.

(14) Fung, K.Y., G.R. Douglas i D. Krewski (1998 r.), '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 i N. Yajima (2000 r.), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen*., 35: 253-259.

(16) Heddle, J.A., H.-J. Martus i G.R. Douglas (2003 r.), '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 i S. Garges (1996 r.), '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 i J.M. Short (1990 r.), '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 id P.A. Burns (2008 r.), '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 i T. Sofuni (1996 r.), '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 i T. Sofuni (1999 r.), '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 i K.I. Masumura (2000 r.), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

(23) OECD (2000 r.), 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, Paryż.

(24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, No 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paryż.

(25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant i K.R. Tindall (1995 r.), '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 i N.J. Gorelick (1997 r.), '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 i C.L. Yauk (2006 r.), '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 i T. Nohmi (2010 r.), '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 i N. Yajima (2003 r.), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res*., 540: 141–151.

(30) Vijg, J. i G.R. Douglas (1996 r.), '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, s. 391–410.

▼**M5**

(31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster i G.R. Douglas (2005 r.), '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 r.), '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, No 145, ENV/JM/MO-NO(2011)20, OECD, Paryż.

(34) Clermont, Y. (1972 r.), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. Physiol. Rev. 52: 198–236.

(35) Robaire, B., Hinton, B.T., i Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', w Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., i P. M, Wassarman (red.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, s. 1071–1148.

(36) Russell, L.B. (2004 r.), '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

Dodatek

DEFINICJE:

Okres podawania: całkowity okres podawania dawek zwierzęciu.

Substytucja par zasad: mutacja powodująca podstawienie pojedynczej zasady azotowej nukleotydów DNA przez inną zasadę azotową nukleotydów DNA.

Kapsyd: płaszcz białkowy otaczający wirion.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Ekspansja klonalna: tworzenie wielu komórek z pojedynczej (zmutowanej) komórki.

Jednostka tworząca kolonię (cfu): miara liczby żywotnych bakterii.

Konkatamer: długa, ciągła biomolekuła zbudowana z wielu jednakowych odcinków połączonych ze sobą na zasadzie *głowa-ogon*.

Region cos: 12-nukleotydowy odcinek jednoniciowego DNA położony na obu końcach dwuniciowego genomu bakteriofagu lambda.

Delecja: mutacja powodująca utratę jednego nukleotydu lub wielu (następujących po kolei) nukleotydów w genomie.

Elektroporacja: zastosowanie impulsów elektrycznych w celu zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych.

Gen endogenny: gen natywny genomu.

Zmienność ponad dwumianowa: zmienność w powtórzonych szacunkach odsetka populacji przewyższająca zmienność, której oczekiwano by, jeżeli dana populacja ma rozkład dwumianowy.

Mutacja spowodowana zmianą fazy odczytu: mutacja genetyczna spowodowana dodaniem lub usunięciem liczby nukleotydów niepodzielnej przez trzy w sekwencji nukleodytów kodującej białko/peptyd.

Insercja: dodanie co najmniej jednej pary zasad azotowych nukleotydów do sekwencji DNA.

Kumulacja (ang. *jackpot*): duża liczba mutacji powstałych w drodze ekspansji klonalnej z pojedynczej mutacji.

Duże delecje: delecje zachodzące w DNA więcej niż kilka kilopar zasad (które są skutecznie wykrywane w badaniach selekcji Spi^- i plazmidu z genem lacZ).

Ligacja: łącznie kowalencyjne dwóch końców cząsteczek DNA z zastosowaniem ligazy DNA.

Mitogen: substancja chemiczna stymulująca komórkę do rozpoczęcia podziału komórki, wywołująca mitozę (tj. podział komórki).

Gen neutralny: gen, na który nie mają wpływu ani pozytywne ani negatywne oddziaływania selektywne.

Pakowanie: synteza zakaźnych cząsteczek fagowych z preparatu kapsydu faga i białek końcowych i konkatameru cząsteczek DNA faga. Powszechnie stosowane do pakowania DNA sklonowanego na wektor lambda (odizolowany przez regiony cos) do zakaźnych cząsteczek lambda.

Wydajność pakowania: wydajność, z którą spakowane bakteriofagi są odzyskiwane w bakterii będącej gospodarzem.

▼**M5**

Jednostka tworząca łysinki (pfu): miary liczby żywotnych bakteriofagów.

Mutacja punktowa: ogólne pojęcie oznaczające mutację mającą wpływ na małą sekwencję DNA, w tym małe insercje, delecje i substytucje par zasad.

Selekcja dodatnia: metoda umożliwiająca przetrwanie jedynie mutacji.

Gen reporterowy: gen, którego produkt modyfikacji genowej jest łatwy do wykrycia.

Czas pobierania próbek: koniec okresu przed uśmierceniem, podczas którego nie podaje się substancji chemicznej, a uszkodzenia DNA zostają utrwalone w postaci stabilnych mutacji.

Wektor wahadłowy: wektor zbudowany tak, aby mógł się namnażać w dwóch różnych gatunkach gospodarzy; zatem DNA wstawione do wektora wahadłowego można badać lub można nim manipulować w dwóch różnych rodzajach komórek lub w dwóch różnych organizmach.

Badana substancja chemiczna: oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

Transgeniczny: należący do organizmu, którego genom został zmieniony w wyniku przeniesienia genu lub genów z innego gatunku; związany z takim organizmem lub będący takim organizmem.

▼M7

B.59. DZIAŁANIE UCZULAJĄCE NA SKÓRĘ *IN CHEMICO*: BEZPOŚREDNIE OZNACZANIE REAKTYWNOŚCI PEPTYDÓW (DPRA)

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) 442C (2015). Substancja działająca uczulająco na skórę oznacza substancję, która wywołuje reakcję alergiczną w następstwie kontaktu ze skórą, określoną przez Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów ONZ (ONZ GHS) (1) oraz rozporządzenie Unii Europejskiej (WE) 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP). ([1]) W niniejszej metodzie badawczej przedstawiono procedurę *in chemico* (bezpośrednie oznaczanie reaktywności peptydów– DPRA), którą należy stosować celem uzyskania rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania zgodnie z GHS ONZ (1) i rozporządzeniem CLP.

Panuje ogólna zgoda co do kluczowych zdarzeń biologicznych stanowiących podstawę działania uczulającego na skórę. Istniejącą wiedzę dotyczącą mechanizmów chemicznych i biologicznych powiązanych z działaniem uczulającym na skórę podsumowano w formie mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych (2), począwszy od molekularnego zdarzenia inicjującego poprzez zdarzenia pośrednie aż do skutku szkodliwego, tj. alergicznego kontaktowego zapalenia skóry u ludzi lub nadwrażliwości kontaktowej u gryzoni. W ramach mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę molekularnym zdarzeniem inicjującym jest wiązanie kowalencyjne substancji elektrofilowych z centrami nukleofilowymi w białkach skóry.

Ocena działania uczulającego na skórę obejmuje na ogół wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych. Klasyczne metody oparte o wykorzystanie świnek morskich, tj. test maksymalizacji na świnkach morskich Magnussona Kligmana (GMPT) i test Buehlera (metoda badawcza B.6 (3)), badają zarówno indukcję, jak i fazy elicytacji działania uczulającego na skórę. Przeprowadzany na myszach test lokalnych węzłów chłonnych (LLNA, metoda badawcza B.42 (4)) i jego dwie nieradioaktywne modyfikacje, LLNA: DA (TM B.50 (5)) i LLNA: BrdU-ELISA (metoda badawcza B.51 (6)), w ramach których ocenia się wyłącznie reakcję indukcyjną, także zyskały akceptację, ponieważ zapewniają one przewagę nad testami prowadzonymi na świnkach morskich pod względem dobrostanu zwierząt i obiektywnego pomiaru fazy indukcyjnej działania uczulającego na skórę.

Ostatnio uznano, że metody badawcze *in chemico* i *in vitro* oparte na analizie mechanistycznej są potwierdzone naukowo jako metody oceny zagrożenia wywołania działania uczulającego na skórę przez substancje chemiczne. Ze względu jednak na ograniczony mechanistyczny zakres mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych w przypadku każdej z obecnie dostępnych metod badawczych niewymagających wykorzystania zwierząt konieczne będzie zastosowanie kombinacji metod (*in silico*, *in chemico* oraz *in vitro*) w ramach zintegrowanych podejść do badań i oceny (IATA), aby móc w pełni zastąpić aktualnie stosowane testy na zwierzętach (2) (7).

Sugeruje się zastosowanie DPRA w celu określenia molekularnego zdarzenia inicjującego mechanizm wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, tj. reaktywności białek, poprzez ilościowe określenie reaktywności badanej substancji chemicznej względem wzorcowych peptydów syntetycznych zawierających lizynę albo cysteinę (8). Następnie wykorzystuje się wartości procentowego obniżenia stężenia peptydu zawierającego cysteinę i lizynę w celu zakwalifikowania substancji do jednej z czterech klas reaktywności do celów rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania (9).

([1]) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

▼M7

DPRA oceniono w ramach badania walidacyjnego przeprowadzonego przez laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach (EURL ECVAM) i późniejszej niezależnej wzajemnej oceny przeprowadzonej przez Naukowy Komitet Doradczy EURL ECVAM (ESAC) i zostało ono uznane za potwierdzone naukowo (10) do celów stosowania jako część IATA celem wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania na potrzeby klasyfikacji zagrożeń i oznakowań. Przykłady zastosowania danych DPRA w połączeniu z innymi informacjami są opisane w literaturze (11) (12) (13) (14).

Definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE, ZASTOSOWANIE I OGRANICZENIA

Korelacja między reaktywnością białek a potencjalnym działaniem uczulającym na skórę jest dobrze znana (15) (16) (17). Z uwagi jednak na fakt, że wiązanie białek stanowi tylko jedno kluczowe zdarzenie, mimo iż jest to molekularne zdarzenie inicjujące mechanizm wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, sama informacja o reaktywności białek wygenerowana przy zastosowaniu metod badawczych i niebadawczych może nie być wystarczająca, aby stwierdzić brak potencjalnego działania uczulającego na skórę substancji chemicznych Dlatego też dane wygenerowane przy zastosowaniu niniejszej metody badawczej należy analizować w kontekście podejść zintegrowanych, takich jak IATA, łącząc je z innymi informacjami uzupełniającymi, tj. pochodzącymi z testów *in vitro* określających inne kluczowe zdarzenia w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, jak również metod niebadawczych, w tym danych z podejść przekrojowych z zastosowaniem analogicznych substancji chemicznych.

Niniejszą metodę badawczą można stosować w połączeniu z innymi informacjami uzupełniającymi celem wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę (tj. kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania w kontekście IATA. Niniejszej metody badawczej nie można stosować samodzielnie ani w celu dalszego klasyfikowania substancji działających uczulająco na skórę do podkategorii 1A i 1B, zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP, ani w celu przewidzenia ich siły działania na potrzeby podjęcia decyzji dotyczących oceny bezpieczeństwa. Jednakże w zależności od ram regulacyjnych sam wynik dodatni w DPRA można wykorzystać celem zaklasyfikowania substancji chemicznej do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP.

Okazało się, że metoda badawcza DPRA może być także przeprowadzana w laboratoriach, które mają doświadczenie w wykonywaniu analiz metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Poziom odtwarzalności prognoz, którego można oczekiwać od tej metody badawczej, ma wartość rzędu 85 % wewnątrz laboratoriów i 80 % pomiędzy laboratoriami (10). Wyniki uzyskane w badaniu walidacyjnym (18) i opublikowanych badaniach (19) ogólnie wskazują na to, że dokładność DPRA w rozróżnianiu substancji działających uczulająco (tj. kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania wynosi 80 % (N=157) z czułością na poziomie 80 % (88/109) i swoistością na poziomie 77 % (37/48) w porównaniu z wynikami testu lokalnych węzłów chłonnych (LLNA). Jest bardziej prawdopodobne, że w wyniku DPRA zostaną zaniżone prognozy dotyczące substancji chemicznych wykazujących niską lub średnią siłę działania uczulającego na skórę (tj. podkategoria 1B wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) niż prognozy dotyczące substancji wykazujących wysoką siłę działania uczulającego na skórę (tj. subkategoria 1A wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) (18) (19). Przedstawione tutaj wartości dokładności DPRA jako samodzielnej metody badawczej są jednak wyłącznie orientacyjne, ponieważ tę metodę badawczą należy rozpatrywać w połączeniu z innymi źródłami informacji w kontekście IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 powyżej. Co więcej, przy ocenie metod niewymagających wykorzystania zwierząt pod kątem działania uczulającego na skórę należy pamiętać, że test LLNA, jak również inne badania na zwierzętach, mogą nie w pełni odzwierciedlać sytuację gatunku będącego przedmiotem zainteresowania, tj. ludzi. Na podstawie ogólnie dostępnych danych wykazano, że DPRA ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych obejmujących szereg organicznych grup funkcyjnych, mechanizmów reagowania, sił działania uczulającego na skórę (jak określono w badaniach *in vivo*) oraz właściwości fizykochemicznych (8) (9) (10) (19). Wszystkie te informacje łącznie wskazują na użyteczność DPRA w identyfikowaniu zagrożenia związanego z działaniem uczulającym na skórę.

▼M7

Termin „badana substancja chemiczna” jest używany w niniejszej metodzie badawczej w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania, i nie jest powiązany z zastosowaniem DPRA do badania substancji lub mieszanin. Niniejsza metoda badawcza nie ma zastosowania do badania związków metali, ponieważ wiadomo, że reagują one z białkami w innych mechanizmach niż wiązania kowalencyjne. Badana substancja chemiczna powinna być rozpuszczalna w odpowiednim rozpuszczalniku o stężeniu końcowym wynoszącym 100 mM (zob. pkt 18). Badane substancje chemiczne, które nie rozpuszczają się w tym stężeniu, można mimo to nadal badać w niższych rozpuszczalnych stężeniach. W takim przypadku wynik dodatni można nadal wykorzystać celem wsparcia identyfikacji badanej substancji chemicznej jako substancji działającej uczulająco na skórę, lecz z wyniku ujemnego nie należy wyciągać żadnego rozstrzygającego wniosku dotyczącego braku reaktywności. Obecnie dostępne są ograniczone informacje na temat możliwości zastosowania DPRA w odniesieniu do mieszanin o znanym składzie (18) (19). Uważa się jednak, że istnieje techniczna możliwość zastosowania DPRA do badania substancji wieloskładnikowych i mieszanin o znanym składzie (zob. pkt 18). Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny. Obecny model prognozowania nie może być stosowany w odniesieniu do złożonych mieszanin o nieznanym składzie lub substancji o nieznanym lub zmiennym składzie, złożonych produktów reakcji lub materiałów biologicznych (tj. substancji UVCB) z uwagi na określony stosunek molowy badanej substancji chemicznej i peptydu. W tym celu konieczne będzie opracowanie nowego modelu prognozowania opartego na podejściu grawimetrycznym. W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania omawianej metody badawczej w odniesieniu do innych konkretnych kategorii substancji chemicznych, metody tej nie należy stosować w odniesieniu do tych konkretnych kategorii substancji chemicznych.

Niniejsza metoda badawcza jest metodą *in chemico*, która nie obejmuje układu metabolicznego. Za pomocą niniejszej metody badawczej nie można wykrywać substancji chemicznych, które wymagają bioaktywacji enzymatycznej do uwolnienia swojego potencjalnego działania uczulającego na skórę (tj. prohaptenów). Istnieją dane, z których wynika, że w niektórych przypadkach za pomocą niniejszej metody badawczej prawidłowo wykrywane są substancje chemiczne, które stają się czynnikami uczulającymi po transformacji abiotycznej (tj. prehapteny) (18). W świetle powyższego wyniki ujemne uzyskane po zastosowaniu tej metody badawczej należy interpretować w kontekście zdefiniowanych ograniczeń i w połączeniu z innymi źródłami informacji w ramach IATA. Badane substancje chemiczne, które nie wiążą się kowalencyjnie z peptydem, lecz wspierają jego utlenianie (tj. dimeryzację cysteiny), mogłyby prowadzić do potencjalnego zawyżenia oszacowania obniżenia stężenia peptydu, skutkując potencjalnymi prognozami fałszywe dodatnimi lub przypisanie do wyższej klasy reaktywności (zob. pkt 29 i 30).

Jak opisano, DPRA pozwala na rozróżnienie substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania. DPRA może się jednak także potencjalnie przyczynić do oceny siły działania uczulającego (11), kiedy stosuje się je w ramach podejść zintegrowanych, takich jak IATA. Wymagane jest jednak przeprowadzenie dalszych prac, najlepiej na podstawie danych dotyczących ludzi, aby ustalić, w jaki sposób wyniki DPRA mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania.

ZASADA BADANIA

DPRA jest metodą *in chemico*, za pomocą której określa się ilościowo stężenie resztkowe peptydu zawierającego cysteinę lub lizynę po 24-godzinnej inkubacji z badaną substancją chemiczną w temperaturze 25 ± 2,5 °C. Tego rodzaju syntetyczne peptydy zawierają fenyloalaninę w celu ułatwienia detekcji. Względne stężenie peptydów mierzy się za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z elucją gradientową i detekcją UV na poziomie 220 nm. Następnie oblicza się wartości procentowego obniżenia stężenia peptydu zawierającego zarówno cysteinę, jak i lizynę oraz wykorzystywane w modelu prognozowania (zob. pkt 29), który pozwala na przypisanie badanej substancji chemicznej do jednej z czterech klas reaktywności stosowanych w celu uzyskania rozróżnienia substancji działających uczulająco i substancji niewykazujących takiego działania.

▼M7

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania opisanej tu metody badawczej laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną z zastosowaniem dziesięciu substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.

PROCEDURA

Niniejsza metoda badawcza opiera się na protokole DPRA DB-ALM n^{r} 154 (20), który reprezentuje protokół wykorzystany w badaniu walidacyjnym koordynowanym przez EURL ECVAM. Zaleca się, aby ten protokół był stosowany przy wdrażaniu i stosowaniu tej metody w laboratorium. Poniżej opisano główne elementy i procedury DPRA. Jeżeli stosuje się alternatywny układ HPLC, należy wykazać jego równoważność w stosunku do zweryfikowanego układu opisanego w protokole DB-ALM (tj. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości ujętych w dodatku 2).

Przygotowanie peptydów zawierających cysteinę lub lizynę

Roztwory podstawowe cysteiny (Ac-RFAA**C**AA-COOH) i lizyny (Ac-RFAA-**K**AA-COOH) zawierające peptydy syntetyczne o czystości powyżej 85 %, a najlepiej w przedziale 90–95 %, powinny zostać świeżo przygotowane tuż przed ich inkubacją z badaną substancją chemiczną. Stężenie końcowe peptydu zawierającego cysteinę powinno wynosić 0,667 mM w buforze fosforanowym o pH 7,5, a stężenie końcowe peptydu zawierającego lizynę powinno wynosić 0,667 mM w roztworze buforowanym octanem amonu o pH 10,2. Należy ustalić sekwencję analiz HPLC w celu utrzymania czasu analizy HPLC wynoszącego mniej niż 30 godzin. W odniesieniu do układu HPLC stosowanego w badaniu walidacyjnym i opisanego w niniejszej metodzie badawczej w pojedynczej analizie HPLC można umieścić do 26 próbek do analizy (które zawierają badaną substancję chemiczną, kontrole dodatnie oraz odpowiednią liczbę kontroli z rozpuszczalnikiem w zależności od liczby poszczególnych rozpuszczalników wykorzystanych w badaniu, przy czym każda jest badana trzykrotnie). We wszystkich kontrpróbach badanych w ramach tej samej analizy należy stosować identyczne roztwory podstawowe peptydów zawierających cysteinę i lizynę. Zaleca się, aby przed użyciem poszczególnych partii peptydów wykazać ich odpowiednią rozpuszczalność.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej

Przed wykonaniem testu należy ocenić rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w odpowiednim rozpuszczalniku zgodnie z procedurą rozpuszczalności opisaną w protokole DPRA DB-ALM (20). Odpowiedni rozpuszczalnik spowoduje całkowite rozpuszczenie badanej substancji chemicznej. Ponieważ w DPRA badana substancja chemiczna jest inkubowana w dużym nadmiarze z peptydami zawierającymi cysteinę albo lizynę, uznaje się, że kontrola wizualna tworzenia się przejrzystego roztworu jest wystarczająca, aby upewnić się, że badana substancja chemiczna (i wszystkie jej składniki w przypadku badania substancji wieloskładnikowej lub mieszaniny) się rozpuściła. Odpowiednimi rozpuszczalnikami są acetonitryl, woda, mieszanina wody i acetonitrylu w stosunku 1:1, izopropanol, aceton lub mieszanina acetonu i acetonitrylu w stosunku 1:1. Inne rozpuszczalniki mogą być stosowane, o ile nie wpływają na stabilność peptydu monitorowaną z próbami kontrolnymi odniesienia C (tj. próbkami, które stanowi sam peptyd rozpuszczony w odpowiednim rozpuszczalniku; zob. dodatek 3). W ostateczności, w przypadku gdy badana substancja chemiczna nie rozpuszcza się w żadnym ze wspomnianych rozpuszczalników, należy podjąć próbę rozpuszczenia tej substancji w 300 µL sulfotlenku dimetylu i rozcieńczyć otrzymany roztwór w 2700 µL acetonitrylu, a jeżeli badana substancja chemiczna nie rozpuszcza się w tej mieszaninie, należy podjąć próbę rozpuszczenia takiej samej ilości badanej substancji chemicznej w 1500 µL sulfotlenku dimetylu i rozcieńczyć otrzymany roztwór w 1500 µL acetonitrylu. Badaną substancję chemiczną należy uprzednio odważyć do szklanych fiolek i bezpośrednio przed badaniem rozpuścić w odpowiednim rozpuszczalniku celem przygotowania roztworu o stężeniu 100 mM. W przypadku mieszanin i substancji wieloskładnikowych o znanym składzie należy ustalić jeden stopień czystości, sumując proporcje ich składników (wyłączając wodę) oraz należy ustalić jedną pozorną masę cząsteczkową, biorąc pod uwagę poszczególne masy cząsteczkowe każdego składnika mieszaniny (wyłączając wodę) i ich poszczególnych proporcji. Otrzymany stopień czystości i pozorną masę cząsteczkową należy następnie wykorzystać do obliczenia masy badanej substancji

▼M7

chemicznej potrzebnej do przyrządzenia roztworu o stężeniu 100 mM. W przypadku polimerów, dla których nie można ustalić dominującej masy cząsteczkowej, do celów sporządzenia roztworu o stężeniu 100 mM można wziąć pod uwagę masę cząsteczkową monomeru (lub pozorną masę cząsteczkową poszczególnych monomerów składających się na polimer). Podczas badania mieszanin, substancji wieloskładnikowych lub polimerów o znanym składzie należy jednak również rozważyć zbadanie czystej substancji chemicznej. W przypadku cieczy czystą substancję chemiczną należy zbadać jako taką bez uprzedniego rozcieńczania przez inkubowanie jej w stosunku molowym 1:10 i 1:50 odpowiednio z peptydami zawierającymi cysteinę i lizynę. W przypadku substancji stałych badaną substancję chemiczną należy rozpuścić do osiągnięcia jej maksymalnego rozpuszczalnego stężenia w tym samym rozpuszczalniku, który wykorzystano do sporządzenia roztworu pozornego o stężeniu 100 mM. Wspomnianą substancję należy następnie zbadać bez dalszego rozcieńczenia przez inkubowanie jej w stosunku molowym 1:10 i 1:50 odpowiednio z peptydami zawierającymi cysteinę i lizynę. Zbieżne wyniki (reaktywne lub niereaktywne) między roztworem pozornym o stężeniu 100 mM a czystą substancją chemiczną powinny umożliwić wyciągnięcie jednoznacznego wniosku co do rezultatu.

Przygotowanie próby kontrolnej dodatniej, prób kontrolnych odniesienia i prób kontrolnych koelucji

Aldehyd cynamonowy (CAS 104-55-2; czystość oznaczająca zdatność do celów spożywczych na poziomie ≥ 95 %) należy stosować jako próbę kontrolną dodatnią w stężeniu 100 mM w acetonitrylu. Inne odpowiednie substancje służące do kontroli dodatniej, najlepiej zapewniające średnie wartości obniżenia stężenia, mogą być stosowane, jeżeli są dostępne dane historyczne pozwalające na uzyskanie porównywalnych kryteriów dopuszczalności serii. Ponadto próby kontrolne odniesienia (tj. próbki zawierające tylko peptyd rozpuszczony w odpowiednim rozpuszczalniku) także powinny być zawarte w sekwencji analiz HPLC i one są stosowane do weryfikacji odpowiedniości układu HPLC przed analizą (próby kontrolne odniesienia A), stabilności prób kontrolnych odniesienia w miarę upływu czasu (próby kontrolne odniesienia B) i celem zweryfikowania, że rozpuszczalnik użyty do rozpuszczania badanej substancji chemicznej nie ma wpływu na procentowe obniżenie stężenia peptydu (próby kontrolne odniesienia C) (zob. dodatek 3). W odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej stosuje się odpowiednią próbę kontrolną odniesienia w celu obliczenia procentowego obniżenia stężenia peptydu dla danej substancji chemicznej (zob. pkt 26). Ponadto w odniesieniu do każdej z badanych substancji chemicznych w sekwencji analiz należy uwzględnić próbę kontrolną koelucji składającą się z samej badanej substancji chemicznej celem wykrycia możliwej koelucji badanej substancji chemicznej z peptydem zawierającym lizynę albo cysteinę.

Inkubacja badanej substancji chemicznej z roztworami z peptydem zawierającym cysteinę i lizynę.

Roztwory z peptydem zawierającym cysteinę i lizynę należy inkubować w szklanych fiolkach z autosamplerem z badaną substancją chemiczną w stosunku molowym odpowiednio 1:10 i 1:50. Jeśli bezpośrednio po dodaniu roztworu z badaną substancją chemiczną do roztworu z peptydem zostanie zauważony osad spowodowany niską rozpuszczalnością badanej substancji chemicznej w wodzie, wówczas nie można mieć pewności, jak duża ilość badanej substancji chemicznej pozostała w roztworze i wejdzie w reakcję z peptydem. W takim przypadku wynik dodatni można zatem nadal wykorzystać, lecz wynik ujemny jest niepewny i należy go interpretować z należytą ostrożnością (zob. także przepisy pkt 11 dotyczące badania substancji chemicznych nierozpuszczalnych w stężeniu do 100 mM). Powstały w wyniku reakcji roztwór należy pozostawić bez dostępu światła w temperaturze 25 ± 2,5 °C przez 24 ± 2 godziny przed przeprowadzeniem analizy HPLC. Każdą badaną substancję chemiczną należy analizować trzykrotnej w odniesieniu do obydwu peptydów. Przed wykonaniem analizy HPLC trzeba przeprowadzić kontrolę wzrokową próbek. Jeżeli zauważy się osad lub rozdzielanie faz, próbki można poddać wirowaniu przy małej prędkości (100–400 xg) w celu wytrącenia osadu na dnie fiolki jako środek ostrożności, ponieważ duże ilości osadu mogą zapchać dreny lub kolumny układu HPLC. Jeżeli po okresie inkubacji zostanie zauważone strącanie lub rozdzielanie faz, obniżenie stężenia peptydu może być niedoszacowane i w przypadku wyniku ujemnego nie można z dostateczną pewnością wyciągnąć wniosku o braku reaktywności.

▼M7

Przygotowanie krzywej wzorcowej do analizy HPLC

Należy wyznaczyć krzywą wzorcową zarówno w odniesieniu do peptydu zawierającego cysteinę, jak i do peptydu zawierającego lizynę. Wzorce peptydów należy przygotować w 20- lub 25-procentowym roztworze buforowym acetonitrylu z buforem fosforanowym (pH 7,5) w przypadku peptydu zawierającego cysteinę i roztworze buforowanym octanem amonu (pH 10,2) w przypadku peptydu zawierającego lizynę. W przypadku stosowania wzorcowych serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym roztworu podstawowego z peptydem (0,667 mM) należy sporządzić 6 roztworów wzorcowych w celu pokrycia zakresu od 0,534 do 0,0167 mM. W krzywej wzorcowej należy również uwzględnić próbę ślepą roztworu buforowego do rozcieńczania. Odpowiednie krzywe wzorcowe powinny mieć r^2>0,99.

Przygotowanie i analiza HPLC

Przed przeprowadzaniem analizy należy zweryfikować, czy układ HPLC jest odpowiedni. Obniżenie stężenia peptydu monitoruje się za pomocą HPLC w połączeniu z detektorem UV (detektor fotodiodowy lub detektor absorbancji o stałej długości fali z sygnałem 220 nm). W układzie HPLC instaluje się odpowiednią kolumnę. W układzie HPLC opisanym w zatwierdzonym protokole stosuje się Zorbax SB-C-18 2,1 mm × 100 mm × 3,5 mikrona jako preferowaną kolumnę. Z taką kolumną w odwróconym układzie faz HPLC cały układ należy pozostawić w temperaturze 30 °C z 50-proc. fazą A (0,1-procentowy (obj.) kwas trifluorooctowy w wodzie) i 50-proc. fazą B (0,085-procentowy (obj.) kwas trifluorooctowy w acetonitrylu) na co najmniej 2 godziny przed analizą. Analizę HPLC należy przeprowadzać z zastosowaniem natężenia przepływu wynoszącego 0,35 ml/min i gradientu liniowego z 10- – 25-procentowym acetonitrylem przez 10 minut, po czym konieczny jest szybki wzrost do 90-proc. acetonitrylu celem usunięcia pozostałych materiałów. Należy wstrzyknąć jednakowe ilości substancji wzorcowej, badanej i kontrolnej. Pomiędzy wstrzyknięciami kolumnę należy ponownie pozostawić w warunkach początkowych na 7 minut. Jeżeli stosuje się inną kolumnę w odwróconym układzie faz HPLC, konieczne będzie dostosowanie opisanych powyżej parametrów początkowych w celu zagwarantowania odpowiedniej elucji i integracji peptydów zawierających cysteinę i lizynę, w tym objętość iniekcji, która może się różnić w zależności od zastosowanego układu (zwykle w zakresie 3–10 µl). Należy zauważyć, że jeżeli stosuje się alternatywny układ HPLC, należy wykazać jego równoważność w stosunku do zweryfikowanego układu opisanego powyżej (tj. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości ujętych w dodatku 2). Absorbancję monitoruje się przy 220 nm. Jeśli stosuje się detektor fotodiodowy, należy także odnotować absorbancję przy 258 nm. Należy wziąć pod uwagę fakt, że niektóre dostawy acetonitrylu mogą wywierać negatywny wpływ na stabilność peptydu i trzeba to ocenić przy stosowaniu nowej partii acetonitrylu. Jako wskaźnik koelucji można stosować stosunek powierzchni piku 220 i powierzchni piku 258. Dla każdej próbki stosunek znajdujący się w przedziale 90 % < średni ([1]) stosunek powierzchni dla próbek kontrolnych < 100 % stanowiłby dobry wskaźnik, że koelucja nie nastąpiła.

Niektóre badane substancje chemiczne mogą wspierać utlenianie peptydu zawierającego cysteinę. Pik dimeryzowanego peptydu zawierającego cysteinę można monitorować wzrokowo. Jeżeli wydaje się, że nastąpiła dimeryzacja, należy to odnotować, ponieważ procentowe obniżenie stężenia peptydu może być przeszacowane, co prowadzi do prognoz fałszywie dodatnich lub przypisania do wyższej klasy reaktywności (zob. pkt 29 i 30).

Analizę HPLC w odniesieniu do peptydów zawierających cysteinę i lizynę można przeprowadzać jednocześnie (jeśli dostępne są dwa układy HPLC) lub w różnych dniach. Jeśli analiza jest przeprowadzana w różnych dniach, wówczas wszystkie roztwory badanej substancji chemicznej powinny być świeżo przygotowane dla obu oznaczeń w każdym dniu. Należy odnotowywać czas analizy w celu zapewnienia, aby iniekcja pierwszej próbki rozpoczęła się 22–24 godzin

([1]) W całym dokumencie średnia oznacza średnią arytmetyczną.

▼M7

po zmieszaniu badanej substancji chemicznej z roztworem z peptydem. Należy ustalić sekwencję analiz HPLC w celu utrzymania czasu analizy HPLC wynoszącego mniej niż 30 godzin. W odniesieniu do układu HPLC stosowanego w badaniu walidacyjnym i opisanego w niniejszej metodzie badawczej w pojedynczej analizie HPLC można umieścić do 26 próbek do analizy (zob. także pkt 17). Przykład sekwencji analizy HPLC jest podany w dodatku 3.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena danych

Stężenie peptydu zawierającego cysteinę lub lizynę określa się w każdej próbce fotometrycznie przy 220 nm, mierząc powierzchnię piku (pole pod krzywą) odpowiednich pików oraz obliczając stężenie peptydu z zastosowaniem liniowej krzywej wzorcowej wyprowadzonej z wzorców.

Procentowe obniżenie stężenia peptydu określa się w każdej próbce, mierząc powierzchnię piku i dzieląc ją przez średnią powierzchnię piku odpowiednich prób kontrolnych odniesienia C (zob. dodatek 3) zgodnie z wzorem opisanym poniżej.

$$\textit{Proc. obniżenie stężenia peptydu} = \left[1 - \left(\frac{\textit{Powierzchnia piku peptydu winiekcji kontrpróby}}{\textit{Śr. pow. piku peptydu prób kontr. odniesienia C}}\right)\right] \times 100$$

Kryteria dopuszczalności

Aby analiza została uznana za ważną, powinny być spełnione następujące kryteria:

a) krzywa wzorcowa powinna mieć r^2>0,99;

b) średnia wartość procentowego obniżenia stężenia peptydu we wszystkich trzech kontrpróbach kontroli dodatniej z aldehydem cynamonowym powinna zawierać się w przedziale 60,8–100 % w przypadku peptydu zawierającego cysteinę i w przedziale 40,2–69,0 % w przypadku peptydu zawierającego lizynę, a maksymalne odchylenie standardowe kontrprób kontroli dodatniej powinno wynosić < 14,9 % w przypadku procentowego obniżenia stężenia cysteiny i < 11,6 % w przypadku procentowego obniżenia stężenia lizyny; oraz

c) średnie stężenie peptydu w próbach kontrolnych odniesienia A powinno mieścić się w przedziale 0,50–± 0,05 mM, a współczynnik zmienności powierzchni piku peptydu dla wszystkich dziewięciu prób kontrolnych odniesienia B i C w acetonitrylu powinien wynosić < 15,0 %.

Jeśli co najmniej jedno z powyższych kryteriów nie jest spełnione, analizę należy powtórzyć.

Aby wyniki badania substancji chemicznej zostały uznane za ważne, powinny być spełnione następujące kryteria:

a) maksymalne odchylenie standardowe dla kontrprób z badaną substancją chemiczną powinno wynosić < 14,9 % w przypadku procentowego obniżenia stężenia cysteiny i < 11,6 % w przypadku procentowego obniżenia stężenia lizyny,

b) średnie stężenie peptydu dla wszystkich trzech prób kontrolnych odniesienia C w odpowiednim rozpuszczalniku powinno zawierać się w przedziale 0,50–± 0,05 mM. Jeśli powyższe kryteria nie są spełnione, dane powinny zostać odrzucone i należy powtórzyć analizę dla tej konkretnej badanej substancji chemicznej.

Model prognozowania

Dla każdej badanej substancji chemicznej oblicza się średnią wartość obniżenia stężenia cysteiny i lizyny. Ujemne obniżenie stężenia uznaje się przy obliczaniu średniej za „0”. Stosując model prognozowania z cysteiną w stosunku 1:10 / lizyną w stosunku 1:50 pokazany w tabeli 1, należy zastosować próg na poziomie 6,38 % średniego obniżenia stężenia peptydu jako pomoc w rozróżnieniu substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania w ramach IATA. Zastosowanie modelu prognozowania w celu przypisania badanej substancji chemicznej do klasy reaktywności (tj. niska, umiarkowana i wysoka reaktywność) może okazać się użyteczne na potrzeby oceny siły działania w ramach IATA.

▼M7

Tabela 1

Model prognozowania (1) **z cysteiną w stosunku 1:10 / lizyną w stosunku 1:50**

Średnie procentowe obniżenie stężenia cysteiny i lizyny	Klasa reaktywności	Prognoza DPRA (2)
0 % ≤ średnie procentowe obniżenie stężenia ≤ 6,38 %	Brak reaktywności lub minimalna reaktywność	Ujemny
6,38 % < średnie procentowe obniżenie stężenia ≤ 22,62 %	Niska reaktywność	Dodatni
22,62 % < średnie procentowe obniżenie stężenia ≤ 42,47 %	Umiarkowana reaktywność	
42,47 % < średnie procentowe obniżenie stężenia ≤ 100 %	Wysoka reaktywność	

(1) Liczby odnoszą się do statystycznie wygenerowanych wartości progowych i nie są związane z precyzją pomiaru.
(2) Prognozę DPRA należy rozpatrywać w ramach IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 i 12.

Mogą zdarzyć się sytuacje, w których badana substancja chemiczna (substancja albo jeden składnik lub kilka składników substancji wieloskładnikowej lub mieszaniny) będzie znacznie absorbowała przy stężeniu 220 nm i będzie miała taki sam czas retencji jak peptyd (koelucja). Problem koelucji można rozwiązać poprzez nieznaczne wyregulowanie układu HPLC w celu dodatkowego oddzielenia czasu elucji badanej substancji chemicznej i peptydu. Jeżeli stosuje się alternatywny układ HPLC w celu rozwiązania problemu koelucji, należy wykazać jego równoważność w stosunku do zweryfikowanego układu opisanego powyżej (tj. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości ujętych w dodatku 2). W przypadku wystąpienia koelucji pik peptydu nie będzie mógł zostać zintegrowany i obliczenie procentowego obniżenia stężenia peptydu nie będzie możliwe. Jeżeli koelucja takich badanych substancji chemicznych wystąpi zarówno w odniesieniu do peptydów zawierających cysteinę, jak i do peptydów zawierających lizynę, analizę należy zgłosić jako niejednoznaczną. W przypadku gdy koelucja wystąpi tylko w przypadku peptydu zawierającego lizynę, wówczas można zastosować model prognozowania z cysteiną w stosunku 1:10 opisany w tabeli 2.

Tabela 2

Model prognozowania (1) **z cysteiną w stosunku 1:10**

Procentowe obniżenie stężenia cysteiny	Klasa reaktywności	Prognoza DPRA (2)
0 % ≤ procentowe obniżenie stężenia cysteiny ≤ 13,89 %	Brak reaktywności lub minimalna reaktywność	Ujemny
13,89 % < procentowe obniżenie stężenia cysteiny ≤ 23,09 %	Niska reaktywność	Dodatni
23,09 % < procentowe obniżenie stężenia cysteiny ≤ 98,24 %	Umiarkowana reaktywność	
98,24 % < procentowe obniżenie stężenia cysteiny ≤ 100 %	Wysoka reaktywność	

(1) Liczby odnoszą się do statystycznie wygenerowanych wartości progowych i nie są związane z precyzją pomiaru.
(2) Prognozę DPRA należy rozpatrywać w ramach IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 i 12.

Mogą zdarzyć się też inne sytuacje, w których nakładanie się czasu retencji badanej substancji chemicznej i jednego z peptydów będzie niepełne. W takich przypadkach można oszacować wartości procentowego obniżenia stężenia peptydu i wykorzystać je w modelu prognozowania z cysteiną w stosunku 1:10 / lizyną w stosunku 1:50, nie można jednak precyzyjnie przypisać badanej substancji chemicznej do klasy reaktywności.

▼M7

Pojedyncza analiza HPLC zarówno dla peptydu zawierającego cysteinę, jak i dla peptydu zawierającego lizynę powinna być wystarczająca dla badanej substancji chemicznej, w przypadku gdy wynik jest jednoznaczny. Jednakże w przypadku wyników zbliżonych do progu stosowanego w celu rozróżnienia wyników dodatnich i ujemnych (tj. wyników granicznych), mogą być potrzebne dodatkowe badania. W sytuacjach, w których średnie procentowe obniżenie stężenia zawiera się w przedziale 3–10 % w przypadku modelu prognozowania z cysteiną w stosunku 1:10 / lizyną w stosunku 1:50 lub procentowe obniżenie stężenia cysteiny zawiera się w przedziale 9–17 % w przypadku modelu prognozowania z cysteiną w stosunku 1:10, należy rozważyć przeprowadzenie drugiej analizy, a także trzeciej analizy w przypadku rozbieżnych wyników dwóch pierwszych analiz.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— Substancja jednoskładnikowa

  — dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

  — wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;

  — czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

  — postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

  — badane stężenie(-a);

  — warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie.

— Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina:

  — opisana w miarę możliwości np. poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, przedstawienie informacji dotyczących występowania ilościowego oraz wskazanie istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej);

  — wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;

  — masa cząsteczkowa lub pozorna masa cząsteczkowa w przypadku mieszanin lub polimerów o znanym składzie lub inne informacje istotne dla przebiegu badania;

  — postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

  — badane stężenie(-a);

  — warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie.

Kontrole

— Kontrola dodatnia

  — dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

  — wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;

  — czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

▼M7

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— badane stężenie(-a);

— warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie;

— odniesienie do wyników historycznych kontroli dodatnich wykazuje odpowiednie kryteria dopuszczalności serii, w stosownych przypadkach.

— Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem

— stosowany rozpuszczalnik/nośnik i stosunek ich elementów składowych, jeżeli są dostępne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS lub inne identyfikatory;

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— wygląd fizyczny, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne w przypadku stosowania innych rozpuszczalników/nośników niż te opisane w metodzie badawczej, w dostępnym zakresie;

— warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie;

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej;

— w odniesieniu do acetonitrylu wyniki badania wpływu na stabilność peptydu.

Przygotowanie peptydów, kontroli dodatniej i badanej substancji chemicznej

— charakterystyka roztworów z peptydami (dostawca, partia, dokładna masa peptydu, ilość dodana do roztworu podstawowego);

— charakterystyka roztworu do kontroli dodatniej (dokładna masa substancji służącej do kontroli dodatniej, objętość dodana do roztworu do badań);

— charakterystyka roztworów z badaną substancją chemiczną (dokładna masa badanej substancji chemicznej, ilość dodana do roztworu do badań).

Ustawienia przyrządu do HPLC oraz analiza HPLC

— rodzaj przyrządu do HPLC, kolumny układu HPLC i kolumny osłonowe, detektor i autosampler;

— parametry istotne dla analizy HPLC, takie jak: temperatura kolumny, objętości iniekcji, natężenie przepływu i gradient.

Odpowiedniość układu

— powierzchnia piku peptydu przy stężeniu 220 nm dla każdej kontrpróby z substancją wzorcową i próbą kontrolną odniesienia A;

— liniowa krzywa wzorcowa przedstawiona graficznie i odnotowana jako r^2;

— stężenie peptydu kontrpróby z próbą kontrolną odniesienia A;

— średnie stężenie peptydu (mM) dla wszystkich trzech prób kontrolnych odniesienia A, SD i CV;

— stężenie peptydu dla prób kontrolnych odniesienia A i C.

▼M7

Sekwencja przeprowadzania analizy

— W odniesieniu do prób kontrolnych odniesienia:

  — powierzchnia piku peptydu przy stężeniu 220 nm dla każdej kontrpróby B i C;

  — średnia powierzchnia piku peptydu przy stężeniu 220 nm dla wszystkich dziewięciu prób kontrolnych odniesienia B i C w acetonitrylu, SD i CV (aby uzyskać stabilność prób kontrolnych odniesienia w czasie analizy);

  — w odniesieniu do każdego stosowanego rozpuszczalnika – średnia powierzchnia piku peptydu przy stężeniu 220 nm dla wszystkich trzech odpowiednich prób kontrolnych odniesienia C (celem obliczenia procentowego obniżenia stężenia peptydu);

  — w odniesieniu do każdego stosowanego rozpuszczalnika – stężenie peptydu (mM) dla wszystkich trzech odpowiednich prób kontrolnych odniesienia C;

  — w odniesieniu do każdego stosowanego rozpuszczalnika – średnie stężenie peptydu (mM) dla wszystkich trzech odpowiednich prób kontrolnych odniesienia C, SD i CV.

— W odniesieniu do kontroli dodatniej:

  — powierzchnia piku peptydu przy stężeniu 220 nm dla każdej kontrpróby;

  — procentowe obniżenie stężenia peptydu dla każdej kontrpróby;

  — średnie procentowe obniżenie stężenia peptydu dla wszystkich trzech kontrprób, SD i CV.

— W odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej:

  — wygląd osadu w mieszaninie powstałej w wyniku reakcji po zakończeniu czasu inkubacji, jeśli osad został zaobserwowany. Czy osad został ponownie rozpuszczony lub odwirowany;

  — występowanie koelucji;

  — w stosownych przypadkach opis wszelkich innych istotnych obserwacji;

  — powierzchnia piku peptydu przy stężeniu 220 nm dla każdej kontrpróby;

  — procentowe obniżenie stężenia peptydu dla każdej kontrpróby;

  — średnie procentowe obniżenie stężenia peptydu dla wszystkich trzech kontrprób, SD i CV;

  — średnie wartości procentowego obniżenia stężenia cysteiny i lizyny;

  — zastosowany model prognozowania i prognoza DPRA.

Badanie biegłości

— w stosownych przypadkach procedura stosowana w celu wykazania biegłości laboratorium w zakresie przeprowadzania metody badawczej (tj. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości) lub do wykazania odtwarzalnego przeprowadzania metody badawczej w miarę upływu czasu.

Omówienie wyników

— omówienie wyników uzyskanych za pomocą metody badawczej DPRA;

— omówienie wyników zastosowania metody badawczej w kontekście IATA, jeżeli są dostępne inne odpowiednie informacje.

Wniosek

▼**M7**

BIBLIOGRAFIA

(1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2013). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). Wydanie piąte zmienione, ONZ Nowy Jork i Genewa, 2013. Dostępne na stronie internetowej: 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. Seria dotycząca badań i oceny nr 168, OECD, Paryż.

(3) Rozdział B.6 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę.

(4) Rozdział B.42 niniejszego załącznika: Test lokalnych węzłów chłonnych

(5) Rozdział B.50 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: test lokalnych węzłów chłonnych: DA.

(6) Rozdział B.51 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: Test lokalnych węzłów chłonnych 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, s. 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) EURL-ECVAM UE (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Dostępne na stronie internetowej: 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, opublikowany w internecie, 14 maja 2013 r., DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. 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, s. 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 i Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625–639.

(16) Dupuis i Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. Nowy Jork i Bazylea: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) EURL ECVAM UE (2012) Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report, 74 s. Dostępny na stronie internetowej: 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, opublikowany w internecie, 9 kwietnia 2013 r., DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing, 17 s. Dostępny na stronie internetowej: 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. Seria OECD dotycząca badań i oceny nr 34, Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż, Francja.

(22) FDA (Urząd ds. Żywności i Leków) (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 22 s. Dostępny na stronie internetowej: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. Europejskie Centrum ds. Ekotoksykologii i Toksykologii Substancji Chemicznych (sprawozdanie techniczne nr 87).

▼M7

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badawczej a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (21).

Mechanizm wywoływania skutków szkodliwych: sekwencja zdarzeń, począwszy od struktury chemicznej docelowej substancji chemicznej lub grupy podobnych substancji chemicznych poprzez molekularne zdarzenie inicjujące aż do pożądanego wyniku *in vivo* (2).

Krzywa wzorcowa: zależność między wartością odpowiedzi doświadczalnej a stężeniem analitycznym (zwana także *krzywą kalibracyjną*) znanej substancji.

Substancja chemiczna: substancja albo mieszanina.

Współczynnik zmienności: miara zmienności wyliczana dla grupy danych dla powtórzeń poprzez podzielenie odchylenia standardowego przez średnią arytmetyczną. Aby przedstawić go w postaci procentowej, można pomnożyć go przez 100.

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub)populacji na taki czynnik.

IATA (zintegrowane podejście do badań i oceny): usystematyzowane podejście stosowane w odniesieniu do identyfikacji zagrożeń (potencjał), charakterystyki zagrożeń (siła oddziaływania) lub oceny bezpieczeństwa (potencjał / siła oddziaływania oraz narażenie) substancji chemicznej lub grupy substancji chemicznych; w ramach tego podejścia w sposób strategiczny integruje się i waży wszystkie istotne dane, które mogą wpłynąć na podjęcie decyzji regulacyjnej dotyczącej potencjalnego zagrożenia, ryzyka lub konieczności podjęcia dalszych ukierunkowanych, a przez to minimalnych badań.

Molekularne zdarzenie inicjujące: indukowane chemicznie zakłócenie układu biologicznego na poziomie molekularnym, które zostało uznane za zdarzenie inicjujące w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z dwóch lub więcej substancji niewchodzących ze sobą w reakcję (1).

Substancja jednoskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

Substancja wieloskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu ≥10 % (w/w) i <80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się poprzez zmieszanie dwóch lub więcej substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

Kontrola dodatnia: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, stopień reakcji dodatniej nie powinien być nadmierny.

Próba kontrolna odniesienia: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, w tym rozpuszczalnik lub nośnik; jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia wyjściowej

▼M7

reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku lub nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą ujemną próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik lub nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badawczej (21).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną (21).

Odtwarzalność: zgodność wyników uzyskanych w wyniku badania tej samej substancji chemicznej przy użyciu tego samego protokołu badania (zob. wiarygodność) (21).

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (21).

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (21).

Substancja: pierwiastki chemiczne i ich związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu (1).

Odpowiedniość układu: określenie wydajności (np. czułości) przyrządu za pomocą analizy wzorca dokonanej przed rozpoczęciem partii analitycznej (22).

Badana substancja chemiczna: termin „badana substancja chemiczna” jest używany w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania.

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (1).

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

Właściwa metoda badawcza: metoda badawcza, którą uznano za wystarczająco istotną i wiarygodną dla danego celu i która opiera się na uzasadnionych naukowo podstawach. Metoda badawcza nie może zostać uznana za właściwą w sensie absolutnym, ale tylko w odniesieniu do określonego celu (21).

▼M7

Dodatek 2

SUBSTANCJE SŁUŻĄCE DO WYKAZANIA BIEGŁOŚCI

Działanie uczulające na skórę *in chemico*: bezpośrednie oznaczenie reaktywności peptydów (DPRA)

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania niniejszej metody badawczej laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, uzyskując oczekiwaną prognozę DPRA dla 10 substancji do oceny biegłości wskazanych w tabeli 1 oraz uzyskując wartości obniżenia stężenia cysteiny i lizyny, które mieszczą się w odpowiednim zakresie odniesienia dla 8 z 10 substancji służących do wykazania biegłości dla każdego peptydu. Substancje służące do wykazania biegłości wybrano w taki sposób, aby odzwierciedlić zakres reakcji na zagrożenia związane z działaniem uczulającym na skórę. Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz danych z badań *in vitro* uzyskanych za pomocą DPRA oraz faktem, że zostały one wykorzystane w badaniu walidacyjnym koordynowanym przez EURL ECVAM w celu wykazania udanego wdrożenia niniejszej metody badawczej w laboratoriach biorących udział w badaniu.

Tabela 1

Zalecane substancje służące do wykazania biegłości technicznej w zakresie bezpośredniego oznaczania reaktywności peptydów

Substancje służące do wykazania biegłości	Numer CAS	Stan skupienia	Prognoza *in vivo* [1]	Prognoza DPRA [2]	Zakres [3] obniżenia stężenia peptydu zawierającego cysteinę w %	Zakres [3] obniżenia stężenia peptydu zawierającego lizynę w %
2,4-chlorodinitro-benzen	97-00-7	Substancja stała	Czynnik uczulający (wyjątkowo silny)	Dodatni	90–100	15–45
Oksazolon	15646-46-5	Substancja stała	Czynnik uczulający (wyjątkowo silny)	Dodatni	60–80	10–55
Formaldehyd	50-00-0	Ciecz	Czynnik uczulający (silny)	Dodatni	30–60	0–24
Benzylidenoaceton	122-57-6	Substancja stała	Czynnik uczulający (umiarkowany)	Dodatni	80–100	0–7
Farnezal	19317-11-4	Ciecz	Czynnik uczulający (słaby)	Dodatni	15–55	0–25
2,3-butanodion	431-03-8	Ciecz	Czynnik uczulający (słaby)	Dodatni	60–100	10–45
1-butanol	71-36-3	Ciecz	Brak działania uczulającego	Ujemny	0–7	0–5,5
6-metylokumaryna	92-48-8	Substancja stała	Brak działania uczulającego	Ujemny	0–7	0–5,5
Kwas mlekowy	50-21-5	Ciecz	Brak działania uczulającego	Ujemny	0–7	0–5,5
4-metoksyaceto-fenon	100-06-1	Substancja stała	Brak działania uczulającego	Ujemny	0–7	0–5,5

([1]) Zagrożenie i prognozy (siły działania) *in vivo* są oparte na danych z badania LLNA (19). Siłę działania *in vivo* określa się na podstawie kryteriów zaproponowanych przez ECETOC (23).
([2]) Prognozę DPRA należy rozpatrywać w ramach IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 i 11.
([3]) Zakresy wyznaczone na podstawie co najmniej 10 wartości obniżenia stężenia uzyskanych przez 6 niezależnych laboratoriów.

▼M7

Dodatek 3

PRZYKŁADOWA SEKWENCJA ANALIZY

Wzorce i próby kontrolne odniesienia	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Roztwór buforowy do rozcieńczania: Próba kontrolna odniesienia A, kontrpróba 1 Próba kontrolna odniesienia A, kontrpróba 2 Próba kontrolna odniesienia A, kontrpróba 3
Próby kontrolne koelucji	Próba kontrolna koelucji 1 dla badanej substancji chemicznej 1 Próba kontrolna koelucji 2 dla badanej substancji chemicznej 2
Próby kontrolne odniesienia	Próba kontrolna odniesienia B, kontrpróba 1 Próba kontrolna odniesienia B, kontrpróba 2 Próba kontrolna odniesienia B, kontrpróba 3
Pierwsza seria kontrprób	Próba kontrolna odniesienia C, kontrpróba 1 Aldehyd cynamonowy, kontrpróba 1 Próba 1, kontrpróba 1 Próba 2, kontrpróba 1
Druga seria kontrprób	Próba kontrolna odniesienia C, kontrpróba 2 Aldehyd cynamonowy, kontrpróba 2 Próba 1, kontrpróba 2 Próba 2, kontrpróba 2
Trzecia seria kontrprób	Próba kontrolna odniesienia C, kontrpróba 3 Aldehyd cynamonowy, kontrpróba 3 Próba 1, kontrpróba 3 Próba 2, kontrpróba 3
Próby kontrolne odniesienia	Próba kontrolna odniesienia B, kontrpróba 4 Próba kontrolna odniesienia B, kontrpróba 5 Próba kontrolna odniesienia B, kontrpróba 6

W sekwencji analizy należy uwzględnić trzy zestawy prób kontrolnych odniesienia (tj. prób składających się wyłącznie z peptydu rozpuszczonego w odpowiednim rozpuszczalniku):
próba kontrolna odniesienia A: stosowana w celu weryfikacji odpowiedniości układu HPLC;
próba kontrolna odniesienia B: stosowana na początku i na końcu sekwencji analizy w celu weryfikacji stabilności prób kontrolnych odniesienia w czasie analizy;
próba kontrolna odniesienia C: stosowana w sekwencji analizy w celu zweryfikowania, czy rozpuszczalnik zastosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej nie wpływa na procentowe obniżenie stężenia peptydu.

▼M7

B.60. BADANIE DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO*: METODA BADAWCZA Z WYKORZYSTANIEM LUCYFERAZY ARE-NRF2

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 442D (2015). Substancja działająca uczulająco na skórę oznacza substancję, która wywołuje reakcję alergiczną w następstwie kontaktu ze skórą, określoną przez Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów ONZ (ONZ GHS) (1) oraz rozporządzenie Unii Europejskiej (WE) 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP). ([1]) W niniejszej metodzie badawczej przedstawiono procedurę *in vitro* (badanie z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2), którą należy stosować uzupełniająco w celu rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania zgodnie z GHS ONZ (1) i rozporządzeniem CLP.

Panuje ogólna zgoda co do kluczowych zdarzeń biologicznych stanowiących podstawę działania uczulającego na skórę. Istniejącą wiedzę dotyczącą mechanizmów chemicznych i biologicznych powiązanych z działaniem uczulającym na skórę podsumowano w formie mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych (2), począwszy od molekularnego zdarzenia inicjującego poprzez zdarzenia pośrednie aż do niekorzystnego skutku dla zdrowia, tj. alergicznego kontaktowego zapalenia skóry u ludzi lub nadwrażliwości kontaktowej u gryzoni (2) (3). Molekularnym zdarzeniem inicjującym jest wiązanie kowalencyjne substancji elektrofilowych z centrami nukleofilowymi w białkach skóry. Drugie kluczowe zdarzenie w tym mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych następuje w keratynocytach i obejmuje reakcje zapalne oraz ekspresję genów powiązaną ze specyficznymi mechanizmami sygnalizacji komórkowej, takimi jak mechanizmy zależne od elementu odpowiedzi antyoksydacyjnej/elektrofilowej (ARE). Trzecim kluczowym zdarzeniem jest aktywacja komórek dendrytycznych, na ogół oceniana na podstawie ekspresji specyficznych markerów powierzchniowych komórki, chemokinów i cytokinów. Czwartym kluczowym zdarzeniem jest proliferacja limfocytów T, która jest oceniana pośrednio w ramach testu lokalnych węzłów chłonnych przeprowadzonego na myszach (4).

Ocena działania uczulającego na skórę obejmuje na ogół wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych. Klasyczne metody oparte o wykorzystanie świnek morskich, tj. test maksymalizacji na świnkach morskich Magnussona Kligmana (GMPT) i test Buehlera (metoda badawcza B.6 (5)), badają zarówno indukcję, jak i fazy elicytacji działania uczulającego na skórę. Przeprowadzany na myszach test lokalnych węzłów chłonnych (LLNA, metoda badawcza B.42 (4)) i jego dwie nieradioaktywne modyfikacje, LLNA: DA (TM B.50 (6)) i LLNA: BrdU-ELISA (metoda badawcza B.51 (7)), w ramach których ocenia się wyłącznie reakcję indukcyjną, także zyskały akceptację, ponieważ zapewniają one przewagę nad testami prowadzonymi na świnkach morskich pod względem dobrostanu zwierząt i obiektywnego pomiaru fazy indukcyjnej działania uczulającego na skórę.

Ostatnio uznano, że metody badawcze *in chemico* i *in vitro* oparte na analizie mechanistycznej są potwierdzone naukowo jako metody oceny zagrożenia wywołania działania uczulającego na skórę przez substancje chemiczne. Ze względu jednak na ograniczony mechanistyczny zakres mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych w przypadku każdej z obecnie dostępnych metod badawczych niewymagających wykorzystania zwierząt konieczne będzie zastosowanie kombinacji metod (*in silico*,*in chemico*oraz *in vitro*) w ramach zintegrowanych podejść do badań i oceny (IATA), aby móc w pełni zastąpić aktualnie stosowane testy na zwierzętach (2) (3).

Proponuje się, aby niniejsza metoda badawcza (badanie z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2) została użyta do określenia drugiego kluczowego zdarzenia, które wyjaśniono w pkt 2. Z dostępnych informacji wynika, że substancje działające uczulająco na skórę wywołują indukcję genów regulowanych elementem odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE) (8) (9). Drobnocząsteczkowe substancje elektrofilowe, takie jak substancje działające uczulająco na skórę, mogą oddziaływać na białko sensorowe Keap1 (białko związane ECH typu Kelch 1), np.

([1]) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

▼M7

poprzez modyfikację kowalencyjną jego reszty cysteinowej, co skutkuje uwolnieniem się tego białka od czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (czynnik jądrowy 2 związany z NF-E2). Zdysocjowany Nrf2 może wówczas aktywować geny zależne od ARE, takie jak geny kodujące enzymy detoksykacyjne II fazy (8) (10) (11).

Obecnie jedynym badaniem z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2 *in vitro* objętym niniejszą metodą badawczą jest badanie KeratinoSens™, w odniesieniu do którego ukończono badania walidacyjne (9) (12) (13), a następnie laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach (EURL ECVAM) przeprowadziło niezależną wzajemną ocenę (14). Badanie KeratinoSens™ za potwierdzone naukowo do celów stosowania jako część IATA celem wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania na potrzeby klasyfikacji zagrożeń i oznakowań (14). Laboratoria, które chcą wdrożyć tę metodę badawczą, mogą otrzymać rekombinowaną linię komórkową wykorzystywaną w badaniu KeratinoSens™, zawierając umowę licencyjną z podmiotem, który opracował tę metodę badawczą (15).

Definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE, ZASTOSOWANIE I OGRANICZENIA

Ponieważ aktywacja mechanizmu Keap1-Nrf2-ARE dotyczy tylko drugiego kluczowego zdarzenia w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, jest mało prawdopodobne, aby informacje uzyskane w wyniku metod badawczych opartych na aktywacji tego mechanizmu zastosowane samodzielnie były wystarczające do tego, aby wyciągnąć wnioski dotyczące potencjalnego działania uczulającego na skórę substancji chemicznych. Dlatego też dane wygenerowane przy zastosowaniu niniejszej metody badawczej należy analizować w kontekście podejść zintegrowanych, takich jak IATA, łącząc je z innymi informacjami uzupełniającymi, tj. pochodzącymi z testów *in vitro* określających inne kluczowe zdarzenia w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, jak również metod niebadawczych, z uwzględnieniem danych z podejść przekrojowych z zastosowaniem analogicznych substancji chemicznych. Przykładowe sposoby zastosowania metody badawczej z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2 w połączeniu innymi informacjami są opisane w literaturze (13) (16) (17) (18) (19).

Niniejsza metoda badawcza może stanowić pomoc w rozróżnieniu substancji działających uczulająco na skórę (tj. kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania w kontekście IATA. Niniejszej metody badawczej nie można stosować samodzielnie ani w celu dalszego klasyfikowania substancji działających uczulająco na skórę do podkategorii 1A i 1B, zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP, ani w celu przewidzenia ich siły działania na potrzeby podejmowania decyzji dotyczących oceny bezpieczeństwa. Jednakże w zależności od ram regulacyjnych sam wynik dodatni można wykorzystać celem zaklasyfikowania substancji chemicznej do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP.

Na podstawie zbioru danych z badania walidacyjnego oraz badań wewnętrznych wykorzystanych do celów niezależnej wzajemnej oceny metody badawczej udowodniono, że badanie KeratinoSens™ można przeprowadzać również w laboratoriach posiadających doświadczenie w zakresie kultury komórkowej. Poziom odtwarzalności prognoz, którego można oczekiwać od tej metody badawczej, ma wartość rzędu 85 % wewnątrz laboratoriów i pomiędzy laboratoriami (14). Dokładność (77 % – 155/201), czułość (78 % – 71/91) i swoistość (76 % – 84/110) badania KeratinoSens™ w zakresie rozróżniania substancji działających uczulająco na skórę (tj. kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania w porównaniu do wyników LLNA obliczono, uwzględniając wszystkie dane przedłożone EURL ECVAM na potrzeby oceny oraz wzajemnej oceny przedmiotowej metody badawczej

▼M7

(14). Podane wartości liczbowe są podobne do niedawno opublikowanych danych opartych na badaniach wewnętrznych około 145 substancji (77-procentowa dokładność, 79-procentowa czułość, 72-procentowa swoistość) (13). Jest bardziej prawdopodobne, że w wyniku badania KeratinoSens™ zostaną zaniżone prognozy dotyczące substancji chemicznych wykazujących niską lub średnią siłę działania uczulającego na skórę (tj. podkategoria 1B wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) niż prognozy dotyczące substancji wykazujących wysoką siłę działania uczulającego na skórę (tj. subkategoria 1A wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) (13) (14). Wszystkie te informacje łącznie wskazują na użyteczność badania KeratinoSens™ w identyfikowaniu zagrożenia związanego z działaniem uczulającym na skórę. Przedstawione tutaj wartości dokładności badania KeratinoSens™ jako samodzielnej metody badawczej są jednak wyłącznie orientacyjne, ponieważ tę metodę badawczą należy rozpatrywać w połączeniu z innymi źródłami informacji w kontekście IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 powyżej. Co więcej, przy ocenie metod niewymagających wykorzystania zwierząt pod kątem działania uczulającego na skórę należy pamiętać, że test LLNA, jak również inne badania na zwierzętach mogą nie w pełni odzwierciedlać sytuację gatunku będącego przedmiotem zainteresowania, tj. ludzi.

Termin „badana substancja chemiczna” jest używany w niniejszej metodzie badawczej w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania, i nie jest powiązany z zastosowaniem metody badawczej z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2 do badania substancji lub mieszanin. Na podstawie obecnie dostępnych danych wykazano, że badanie KeratinoSens™ ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych obejmujących szereg organicznych grup funkcyjnych, mechanizmów reagowania, sił działania uczulającego na skórę (jak określono w badaniach *in vivo*) oraz właściwości fizykochemicznych (9) (12) (13) (14). Badaniu poddano głównie substancje jednoskładnikowe, chociaż istnieje również ograniczona ilość danych dotyczących badania mieszanin (20). Niniejsza metoda badawcza ma jednak zastosowanie techniczne w odniesieniu do badania zarówno substancji wieloskładnikowych, jak i mieszanin. Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy jednak zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny. Ponadto podczas badania substancji wieloskładnikowych lub mieszanin należy rozważyć możliwe zakłócenie obserwowanych reakcji przez składniki cytotoksyczne. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych, które są rozpuszczalne lub tworzą stabilną dyspersję (tj. koloid bądź zawiesinę, w których badana substancja chemiczna nie osadza się ani nie oddziela od rozpuszczalnika w różne fazy) w wodzie lub w sulfotlenku dimetylu (uwzględniając wszystkie składniki badanej substancji chemicznej w przypadku badania substancji wieloskładnikowej lub mieszaniny). Badane substancje chemiczne, które nie spełniają powyższych warunków w najwyższym wymaganym stężeniu końcowym 2 000 μM (por. pkt 22), mogą być nadal badane w niższych stężeniach. W takim przypadku wyniki spełniające kryteria uznania za wyniki dodatnie opisane w pkt 39 można nadal wykorzystać celem wsparcia identyfikacji badanej substancji chemicznej jako substancji działającej uczulająco na skórę, natomiast wynik ujemny uzyskany przy stężeniach < 1 000 μM należy uznać za niejednoznaczny (zob. model prognozowania w pkt 39). Zasadniczo substancje o LogP do 5 zostały zbadane z powodzeniem, natomiast substancje skrajnie hydrofobowe o LogP powyżej 7 wykraczają poza znany zakres zastosowania tej metody badawczej (14). W przypadku substancji o LogP wynoszącym 5–7 dostępne są jedynie ograniczone informacje.

Wyniki ujemne należy interpretować ostrożnie, ponieważ substancje, które wykazują reaktywność wyłącznie wobec reszt lizynowych, mogą być wykrywane w ramach niniejszej metody badawczej jako dające wynik ujemny. Ponadto z powodu ograniczonej wydolności metabolicznej zastosowanych linii komórkowych (21) i z powodu warunków doświadczalnych prohapteny (tj. substancje chemiczne wymagające aktywacji enzymatycznej np. przez enzymy P450) oraz prehapteny (tj. substancje chemiczne aktywowane przez samoutlenianie), w szczególności te o niskim tempie utleniania, również mogą dawać wyniki ujemne. Badane substancje chemiczne, które nie mają działania uczulającego, ale mimo to stanowią drażniące substancje chemiczne, mogą z kolei doprowadzić do otrzymania wyników fałszywie dodatnich (14). Ponadto badane substancje chemiczne o wysokiej cytotoksyczności nie zawsze można ocenić w sposób wiarygodny. Co więcej, badane substancje chemiczne, które zakłócają działanie enzymu lucyferazy, mogą zakłócać aktywność lucyferazy w badaniach opartych na komórkach, powodując inhibicję pozorną albo zwiększoną luminescencję (22). Na przykład

▼M7

z dostępnych informacji wynika, że stężenia fitoestrogenu wyższe niż 1 μM zakłócają sygnały luminescencyjne w innych badaniach genów reporterowych opartych na lucyferazie z powodu nadaktywacji lucyferazowego genu reporterowego (23). W rezultacie należy ostrożnie badać ekspresję lucyferazy uzyskaną przy wysokich stężeniach fitoestrogenów lub podobnych substancji chemicznych, co do których przypuszcza się, że wywołują one – podobnie jak fitoestrogeny – nadaktywację lucyferazowego genu reporterowego (23). W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania omawianej metody badawczej w odniesieniu do innych konkretnych kategorii badanych substancji chemicznych, metody tej nie należy stosować w odniesieniu do tych konkretnych kategorii substancji chemicznych.

Poza tym, że ułatwia rozróżnianie między substancjami działającymi uczulająco na skórę a substancjami niewykazującymi działania uczulającego na skórę, badanie KeratinoSens™ dostarcza również informacji na temat zależności stężenie-odpowiedź, które mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania uczulającego w przypadku ich wykorzystania w ramach podejść zintegrowanych, takich jak IATA (19). Wymagane jest jednak przeprowadzenie dalszych prac, najlepiej na podstawie wiarygodnych danych dotyczących ludzi, aby ustalić, w jaki sposób wyniki badania KeratinoSens™ mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania (24) oraz na możliwość podzielenia czynników uczulających na podkategorie zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP.

ZASADA BADANIA

W metodzie badawczej z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2 stosuje się unieśmiertelnioną przylegającą linię komórkową pozyskaną z keratynocytów człowieka HaCaT poddanych stabilnej transfekcji przy użyciu selekcyjnego plazmidu. Linia komórkowa zawiera gen lucyferazy podlegający kontroli transkrypcyjnej ze strony promotora konstytutywnego skondensowanego z elementem ARE genu, co do którego wiadomo, że jego ekspresja podlega zwiększeniu wskutek styczności z alergenami kontaktowymi (25) (26). Sygnał lucyferazy świadczy o aktywacji endogennych genów zależnych Nrf2 wskutek oddziaływania czynników uczulających, przy czym wykazano istnienie zależności między sygnałem lucyferazy w rekombinowanej linii komórkowej a Nrf2 (27). Zastosowanie tej metody daje możliwość dokonania ilościowego pomiaru (w drodze detekcji luminescencyjnej) indukcji genu lucyferazy przy wykorzystaniu powszechnie stosowanych substratów lucyferazy generujących światło jako wskaźnika aktywności czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w komórkach, które zostały narażone na działanie substancji elektrofilowych.

Badane substancje chemiczne uznaje się za dodatnie w ramach badania KeratinoSensTM, jeżeli wywołują statystycznie istotną indukcję aktywności lucyferazy powyżej określonego progu (tj. co najmniej 1,5-krotny wzrost lub wzrost o 50 %) przy danym stężeniu, które nie wywiera istotnego wpływu na żywotność komórek (tj. poniżej 1000 μM przy stężeniu, w którym żywotność komórek utrzymuje się powyżej 70 % (9) (12)). W tym celu oznacza się maksymalną krotność indukcji aktywności lucyferazy w ramach (ujemnej) próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem (I_{max}). Ponadto, biorąc pod uwagę fakt, że komórki są poddawane działaniu badanych substancji chemicznych w szeregu stężeń, poziom stężenia niezbędny do wywołania statystycznie istotnej indukcji aktywności lucyferazy powyżej określonego progu (tj. wartości $EC_{1,5}$) należy interpolować z krzywej dawka-efekt (aby zapoznać się ze stosownymi obliczeniami, zob. pkt 32). Należy również przeprowadzić równoległe pomiary cytotoksyczności, aby ocenić, czy do indukcji aktywności lucyferazy dochodzi również przy stężeniach niższych niż stężenia cytotoksyczne.

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2 zgodnego z niniejszą metodą badawczą laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną z zastosowaniem dziesięciu substancji służących do wykazania biegłości wskazanych w dodatku 2.

Aby usprawnić proces walidacji nowych lub zmienionych metod badawczych wykorzystywanych do badania lucyferazy ARE-Nrf2 *in vitro* podobnych do badania KeratinoSensTM i aby umożliwić terminowe modyfikowanie niniejszej metody badawczej w celu uwzględnienia tych metod badawczych, można skorzystać z dostępnych standardów wykonywania badań (PS) (28). Wzajemne uznawanie danych (MAD) zgodnie z porozumieniem OECD będzie możliwe wyłącznie w przypadku metod badawczych zweryfikowanych zgodnie ze standardem wykonywania badań, jeżeli te metody badawcze zostały poddane przeglądowi i włączone do odpowiednich wytycznych OECD dotyczących badań.

▼M7

PROCEDURA

Obecnie jedyną metodą objętą niniejszą metodą badawczą jest potwierdzone naukowo badanie KeratinoSens™ (9) (12) (13) (14). Standardowe procedury operacyjne dotyczące badania KeratinoSens™ są dostępne i należy z nich korzystać przy wdrażaniu niniejszej metody badawczej i stosowaniu jej w warunkach laboratoryjnych (15). Laboratoria, które chcą wdrożyć tę metodę badawczą, mogą otrzymać rekombinowaną linię komórkową wykorzystywaną w badaniu KeratinoSens™, zawierając umowę licencyjną z podmiotem, który opracował tę metodę badawczą. W poniższych punktach opisano najistotniejsze elementy i procedury związane z metodą badawczą wykorzystywaną do badania lucyferazy ARE-Nrf2.

Przygotowanie kultur keratynocytów

Należy korzystać z transgenicznej linii komórkowej o stabilnej insercji genu reporterowego lucyferazy pod kontrolą elementu ARE (np. linii komórkowej KeratinoSensTM). Po odebraniu komórek rozmnaża się je (np. od dwóch do czterech pasaży) i przechowuje się je zamrożone jako jednorodny zbiór. Komórki pochodzące z tego pierwotnego zbioru można rozmnażać do momentu osiągnięcia maksymalnej dozwolonej liczby pasaży (tj. 25 w przypadku KeratinoSens™), po czym wykorzystuje się je w ramach rutynowych badań przeprowadzanych przy wykorzystaniu odpowiedniej pożywki utrzymującej (w przypadku KeratinoSens™ za taką pożywkę uznaje się pożywkę DMEM zawierającą surowicę i Genetycynę).

Na potrzeby badania komórki powinny zlewać się w 80–90 %, przy czym należy dopilnować, aby komórki nigdy nie osiągnęły stadium pełnej konfluencji. Na dzień przed przeprowadzeniem badania komórki pobiera się i umieszcza w dołkach 96-dołkowych płytek (10 000 komórek na dołek w przypadku KeratinoSens™). Należy zadbać o to, by w trakcie osadzania nie dochodziło do przypadków powstawania osadu komórkowego, aby zapewnić jednorodny rozkład liczby komórek we wszystkich dołkach. Powstanie takiego osadu może doprowadzić do dużego zróżnicowania liczby komórek w poszczególnych dołkach. Do celów pomiaru aktywności lucyferazy w ramach każdego powtórzenia wykorzystuje się trzy kontrpróby, a w badaniu żywotności komórek wykorzystuje się jedną równoległą kontrpróbę.

Przygotowanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej

Badaną substancję chemiczną oraz substancje kontrolne przygotowuje się w dniu przeprowadzenia badania. W przypadku badania KeratinoSens™ badane substancje chemiczne rozpuszcza się w sulfotlenku dimetylu (DMSO) do chwili uzyskania pożądanego stężenia końcowego (np. 200 mM). Roztwory sulfotlenku dimetylu można uznać za samo sterylizujące się, dlatego też w ich przypadku dokonanie sterylizacji przez filtrowanie nie jest konieczne. Badaną substancję chemiczną, która nie rozpuszcza się w sulfotlenku dimetylu, należy rozpuścić w sterylnej wodzie lub w podłożu, po czym uzyskane roztwory należy poddać sterylizacji np. przez filtrowanie. W przypadku badanej substancji chemicznej, która nie posiada określonej masy cząsteczkowej, w ramach badania KeratinoSens™ przygotowuje się roztwór podstawowy o domyślnym stężeniu (40 mg/ml lub 4 % (w/v)). W przypadku zastosowania rozpuszczalników innych niż sulfotlenek dimetylu, woda lub podłoże należy przedstawić odpowiednie uzasadnienie naukowe.

W oparciu o podstawowe roztwory uzyskane po rozpuszczeniu badanej substancji chemicznej w sulfotlenku dimetylu sporządza się serie stężeń wzrastających w postępie geometrycznym, co pozwala przygotować 12 głównych stężeń substancji chemicznej, które mają zostać wykorzystane w badaniu (od 0,098 do 200 mM w badaniu KeratinoSens™). Jeżeli badana substancja chemiczna nie jest rozpuszczalna w sulfotlenku dimetylu, serie stężeń sporządzane w celu przygotowania głównych stężeń przeprowadza się przy wykorzystaniu sterylnej wody lub sterylnego podłoża. Niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika stężenia główne rozcieńcza się następnie 25-krotnie w podłożu zawierającym surowicę i wykorzystuje się je w celu poddania działaniu substancji chemicznej, stosując dodatkowy 4-krotny współczynnik rozcieńczenia, aby stężenia końcowe badanej substancji chemicznej mieściły się w zakresie od 0,98 do 2000 μM w ramach badania KeratinoSens™. Jeżeli zostanie to odpowiednio uzasadnione, można również zastosować alternatywne stężenia (np. w przypadku wystąpienia cytotoksyczności lub w przypadku wystąpienia słabej rozpuszczalności).

W ramach kontroli ujemnej (z rozpuszczalnikiem) wykorzystywanej w badaniu KeratinoSens™ stosuje się sulfotlenek dimetylu (nr CAS 67-68-5, ≥ 99 % czystości), na potrzeby którego przygotowuje się sześć dołków na płytkę. Próbę tę poddaje się takiej samej procedurze rozcieńczania jak opisana w pkt 22 procedura przewidziana dla stężeń głównych, aby stężenie końcowe w negatywnej próbie kontrolnej (z rozpuszczalnikiem) wynosiło 1 %, nie wywierało wpływu

▼M7

na żywotność komórek i odpowiadało stężeniu sulfotlenku dimetylu w badanej substancji chemicznej i w kontroli dodatniej. Jeżeli badana substancja chemiczna nie jest rozpuszczalna w sulfotlenku dimetylu, który został rozcieńczony w wodzie, poziom stężenia sulfotlenku dimetylu we wszystkich dołkach, w których ma zostać umieszczony końcowy roztwór do badań, musi wynosić 1 %, podobnie jak ma to miejsce w przypadku innych substancji chemicznych i substancji kontrolnych.

Za kontrolę dodatnią w badaniu KeratinoSens™ uznaje się aldehyd cynamonowy (nr CAS 14371-10-9, ≥ 98 % czystości), na potrzeby którego przygotowuje się serie 5 stężeń głównych wynoszących od 0,4 do 6,4 mM w sulfotlenku dimetylu (z roztworu podstawowego o stężeniu 6,4 mM), który następnie rozcieńcza się zgodnie z opisaną w pkt 22 procedurą przewidzianą dla stężeń głównych, aby stężenie końcowe kontroli dodatniej mieściło się w zakresie od 4 do 64 μM. Dopuszcza się również możliwość wykorzystania innych kontroli dodatnich, najlepiej kontroli o wartości $EC_{1,5}$ mieszczącej się w średnim zakresie, jeżeli istnieją dane historyczne, na podstawie których można ustanowić porównywalne kryteria dopuszczalności.

Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej

W odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej i substancji służącej do kontroli dodatniej należy przeprowadzić jedno doświadczenie obejmujące co najmniej dwa niezależne powtórzenia, w ramach których wykorzystuje się trzy kontrpróby (tj. n=6), aby sformułować prognozę (dodatnią lub ujemną). Jeżeli wyniki uzyskane po dokonaniu dwóch niezależnych powtórzeń są rozbieżne, należy przeprowadzić trzecie powtórzenie z wykorzystaniem trzech kontrprób (tj. n=9). Każde niezależne powtórzenie przeprowadza się innego dnia przy wykorzystaniu świeżego roztworu podstawowego badanych substancji chemicznych oraz niezależnie pozyskanych komórek. Komórki mogą jednak pochodzić z tego samego pasażu.

Po osadzeniu komórek w sposób opisany w pkt 20 hoduje się je przez 24 godziny na płytkach 96-dołkowych. Następnie podłoże usuwa się i zastępuje się je świeżym podłożem (w przypadku KeratinoSens™ podłożem o objętości 150 μl zawierającym surowicę, ale niezawierającym Genetycyny), do którego dodaje się 50 μl 25-krotnie rozcieńczonej badanej i kontrolnej substancji chemicznej. Co najmniej jeden dołek na każdej płytce powinien pozostać niewypełniony (brak komórek i niepoddanie działaniu substancji chemicznej), aby ocenić wartości tła.

Następnie płytki poddane działaniu substancji chemicznej inkubuje się przez około 48 godzin w temperaturze 37 ± 1 °C i przy obecności 5 % CO_2 w ramach badania KeratinoSens™. Należy dołożyć starań, aby nie dopuścić do odparowania lotnych badanych substancji chemicznych i aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu między dołkami zawierającymi badane substancje chemiczne, np. przykrywając dołki folią przed rozpoczęciem inkubacji z wykorzystaniem badanych substancji chemicznych.

Pomiar aktywności lucyferazy

Trzy czynniki mają kluczowe znaczenie dla zapewnienia prawidłowości pomiarów luminescencji:

— wybór odpowiednio czułego lumenometru;

— korzystanie z płytki wysokości odpowiedniej do tego, by zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu światłem; oraz

— korzystanie z substratu lucyferazy o natężeniu światła wystarczającym do zapewnienia dostatecznej czułości i niskiego poziomu zróżnicowania wyników.

Przed przystąpieniem do badania należy przeprowadzić doświadczenie kontrolne zgodnie z układem opisanym w dodatku 3, aby zapewnić spełnienie tych trzech kryteriów.

Po upływie 48-godzinnego okresu narażenia na działanie badanej substancji chemicznej i substancji kontrolnej w ramach badania KeratinoSens™ komórki przemywa się roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami, po czym do każdego dołka na 20 min dodaje się odpowiedni bufor do przeprowadzania lizy w temperaturze pokojowej w celu dokonania pomiaru luminescencji.

▼M7

Następnie płytki z lizatami komórkowymi umieszcza się w celu przeprowadzenia pomiaru w lumenometrze, który w ramach badania KeratinoSens™ jest zaprogramowany w następujący sposób: (i) dodanie substratu lucyferazy do każdego dołka (tj. 50 µl); (ii) odczekanie 1 sekundy; (iii) integrowanie aktywności lucyferazy przez 2 sekundy. W przypadku zastosowania innych ustawień, np. z uwagi korzystanie z innego modelu lumenometru, należy przedstawić stosowne uzasadnienie. Ponadto można również zastosować substrat jarzeniowy, o ile warunki dotyczące kontroli jakości doświadczenia ustanowione w dodatku 3 zostały spełnione.

Ocena cytotoksyczności

W ramach badania KeratinoSens™ dotyczącego żywotności komórek po upływie 48-godzinnego okresu narażenia na działanie substancji pożywkę zastępuje się świeżą pożywką zawierającą bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy (MTT) (nr CAS 298-93-1), a komórki inkubuje się przez 4 godziny w temperaturze 37 °C i w obecności 5 % CO_2. Następnie pożywka zawierająca bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy jest usuwana, a komórki są poddawane lizie (np. poprzez dodanie 10-procentowego roztworu laurylosiarczanu sodu) przez całą noc. Po zakończeniu wytrząsania poziom absorpcji mierzy się fotometrem przy 600 nm.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena danych

W ramach badania KeratinoSens™ oblicza się następujące parametry:

— wartość maksymalnej średniej krotności indukcji aktywności lucyferazy (I_{max}) zaobserwowana dla poszczególnych stężeń badanej substancji chemicznej i kontroli dodatniej;

— wartość $EC_{1,5}$ odpowiadająca stężeniu, przy którym indukcja aktywności lucyferazy przekracza 1,5-krotność progu (tj. 50 % wartości zwiększonej aktywności lucyferazy); oraz

— wartości stężenia IC_{50} i IC_{30} przy zmniejszeniu żywotności komórek odpowiednio o 50 % i 30 %.

— Krotność indukcji aktywności lucyferazy oblicza się zgodnie z równaniem 1, natomiast ogólną maksymalną krotność indukcji (I_{max}) oblicza się jako średnią dla poszczególnych powtórzeń.

Równanie 1:

$$krotność\ indukcji = \frac{(L_{próbka} - L_{próba\ ślepa})}{(L_{rozpuszczalnik} - L_{próba\ ślepa})}$$

gdzie:

$L_{próbka}$ oznacza poziom luminescencji zmierzony w dołku, do którego wprowadzono badaną substancję chemiczną

$L_{próba\ ślepa}$ oznacza poziom luminescencji zmierzony w dołku stanowiącym próbę ślepą, do którego nie wprowadzono żadnych komórek i którego nie poddano działaniu żadnej substancji chemicznej

$L_{rozpuszczalnik}$ oznacza średni poziom luminescencji zmierzony w dołkach zawierających komórki i (ujemną) kontrolę z rozpuszczalnikiem

Wartość $EC_{1,5}$ oblicza się w drodze interpolacji liniowej przeprowadzanej zgodnie z równaniem 2, natomiast wartość ogólnego $EC_{1,5}$ oblicza się, wyciągając średnią geometryczną z poszczególnych powtórzeń.

Równanie 2:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

gdzie:

C_a oznacza najniższe stężenie w µM przy krotności indukcji > 1,5

C_b oznacza najwyższe stężenie w µM przy krotności indukcji < 1,5

I_a oznacza krotność indukcji zmierzoną dla najniższego stężenia przy krotności indukcji > 1,5 (średnia wartość z trzech dołków stanowiących kontrpróbę)

I_b oznacza krotność indukcji zmierzoną dla najwyższego stężenia przy krotności indukcji > 1,5 (średnia wartość z trzech dołków stanowiących kontrpróbę)

Żywotność oblicza się zgodnie z równaniem 3:

Równanie 3:

$$Żywotność = \frac{(V_{próbka} - V_{próba\ ślepa})}{V_{rozpuszczalnik} - V_{próba\ ślepa}} \times 100$$

gdzie:

$V_{próbka}$ oznacza wartość absorbancji MTT zmierzoną w dołku zawierającym badaną substancję chemiczną

$V_{próba\ ślepa}$ oznacza wartość absorbancji MTT zmierzoną w dołku stanowiącym próbę ślepą, do którego nie wprowadzono żadnych komórek i którego nie poddano działaniu żadnej substancji chemicznej

$V_{rozpuszczalnik}$ oznacza średnią wartość absorbancji MTT zmierzoną w dołkach zawierających komórki i (ujemną) kontrolę z rozpuszczalnikiem

Wartość IC_{50} i IC_{30} oblicza się w drodze interpolacji liniowej przeprowadzanej zgodnie z równaniem 4, natomiast wartość ogólnego IC_{50} i IC_{30} oblicza się, wyciągając średnią geometryczną z poszczególnych powtórzeń.

Równanie 4:

$$IC_x = (C_b - C_\alpha) \times \left(\frac{(100 - x) - V_\alpha}{V_b - V_\alpha}\right) + C_\alpha$$

gdzie:

X stanowi wyrażony procentowo spadek przy danym stężeniu, który należy obliczyć (50 i 30 dla IC_{50} i IC_{30})

C_a oznacza najniższe stężenie w µM przy spadku żywotności > x %

C_b oznacza najwyższe stężenie w µM przy spadku żywotności < x %

V_a oznacza wyrażoną procentowo żywotność dla najniższego stężenia przy spadku żywotności > x %

V_b oznacza wyrażoną procentowo żywotność dla najwyższego stężenia przy spadku żywotności < x %

Dla każdego stężenia, przy którym odnotowuje się krotność indukcji aktywności lucyferazy > 1,5, oblicza się poziom istotności statystycznej (np. w ramach dwustronnego testu t-Studenta), porównując wartości luminescencji odnotowane w odniesieniu do trzech kontrprób z wartościami luminescencji w dołkach, do których dodano (ujemną) kontrolę z rozpuszczalnikiem, aby ustalić, czy indukcja aktywności lucyferazy jest statystycznie istotna ($p < 0,05$). Wartość $EC_{1,5}$ zależy od wartości najniższego stężenia przy krotności indukcji aktywności lucyferazy > 1,5. W każdym przypadku sprawdza się, czy wartość ta jest niższa niż wartość IC_{30}, co oznaczałoby, że spadek żywotności komórek przy stężeniu oznaczającym $EC_{1,5}$ jest mniejszy niż 30 %.

▼M7

Zaleca się poddanie danych kontroli wzrokowej w oparciu o wykresy. W przypadku nieodnotowania wyraźnej krzywej dawka-efekt lub w przypadku, gdy zaobserwowana krzywa dawka-efekt jest dwufazowa (tj. dwukrotnie przekracza próg 1,5), doświadczenie należy powtórzyć, aby upewnić się, czy wynik ten jest specyficzny dla badanej substancji chemicznej, czy też jest spowodowany wystąpieniem artefaktu w doświadczeniu. Jeżeli reakcja dwufazowa jest możliwa do odtworzenia w ramach odrębnego doświadczenia, należy zgłosić niższą wartość $EC_{1,5}$ (stężenie przy pierwszym przekroczeniu progu 1,5).

W rzadkich przypadkach, w których wystąpi statystycznie nieistotna indukcja powyżej progu 1,5-krotności, po której odnotowane zostanie wyższe stężenie, w przypadku którego wystąpi statystycznie istotna indukcja, wyniki takiego powtórzenia uznaje się za ważne i dodatnie wyłącznie w przypadku, gdy w odniesieniu do stężenia niecytotoksycznego odnotowano statystycznie istotną indukcję powyżej progu 1,5.

Ponadto w przypadku badanych substancji chemicznych generujących 1,5-krotną lub większą indukcję już przy najniższym poziomie badanego stężenia wynoszącym 0,98 μM, na podstawie kontroli wzrokowej przeprowadzanej w oparciu o przebieg krzywej dawka-efekt wartość $EC_{1,5}$ ustala się na poziomie < 0,98.

Kryteria dopuszczalności

Przy korzystaniu z badania KeratinoSens™ należy spełnić następujące kryteria dopuszczalności. Po pierwsze, indukcja aktywności lucyferazy uzyskana po zastosowaniu substancji służącej do kontroli dodatniej, tj. aldehydu cynamonowego, powinna być statystycznie istotna powyżej progu 1,5 (np. stosując test t-Studenta) w odniesieniu do co najmniej jednego zbadanego stężenia (od 4 to 64 μM).

Po drugie, wartość $EC_{1,5}$ powinna mieścić się w przedziale dwóch odchyleń standardowych średniej historycznej w danej placówce badawczej (np. między 7 μM a 30 μM w oparciu o zbiór danych dotyczących walidacji), która powinna być regularnie aktualizowana. Ponadto średnia indukcja odnotowana w trzech kontrpróbach, w których zastosowano aldehyd cynamonowy w stężeniu 64 μM, powinna mieścić się w przedziale od 2 do 8. Jeżeli to ostatnie kryterium nie zostanie spełnione, należy uważnie monitorować zależność dawka-odpowiedź w przypadku aldehydu cynamonowego, a wyniki badań można uznać za dopuszczalne wyłącznie w przypadku, gdy zaobserwowana zostanie wyraźna zależność dawka-odpowiedź w kontekście wzrostu indukcji aktywności lucyferazy przy zwiększających się stężeniach kontroli dodatniej.

Średni współczynnik zmienności poziomu luminescencji zmierzonego dla kontroli ujemnej (z rozpuszczalnikiem), w której wykorzystano sulfotlenek dimetylu, powinien być niższy niż 20 % w każdym powtórzeniu, które obejmuje 6 dołków badanych trójkami. Jeżeli poziom zmienności będzie wyższy, wyniki należy odrzucić.

Interpretacja wyników i model prognozowania

Prognozę KeratinoSens™ uznaje się za dodatnią, jeżeli wszystkie 4 przedstawione poniżej warunki zostaną spełnione w dwóch na dwa powtórzenia lub w tych samych dwóch na trzy powtórzenia – w przeciwnym wypadku prognozę KeratinoSens™ uznaje się za ujemną (wykres 1):

1. wartość I_{max} jest wyższa niż (>) 1,5-krotność i w statystycznie istotny sposób różna od wartości odnotowanej w (ujemnej) kontroli z rozpuszczalnikiem (ustalonej zgodnie z dwustronnym, niesparowanym testem t-Studenta);

2. żywotność komórek jest wyższa niż (>) 70 % przy najniższym stężeniu, w przypadku którego odnotowuje się ponad 1,5-krotną indukcję aktywności lucyferazy (tj. przy stężeniu oznaczającym $EC_{1,5}$);

3. wartość $EC_{1,5}$ jest mniejsza niż (<) 1 000 μM (lub < 200 μg/ml w przypadku badanych substancji chemicznych, dla których nie ustalono masy cząsteczkowej);

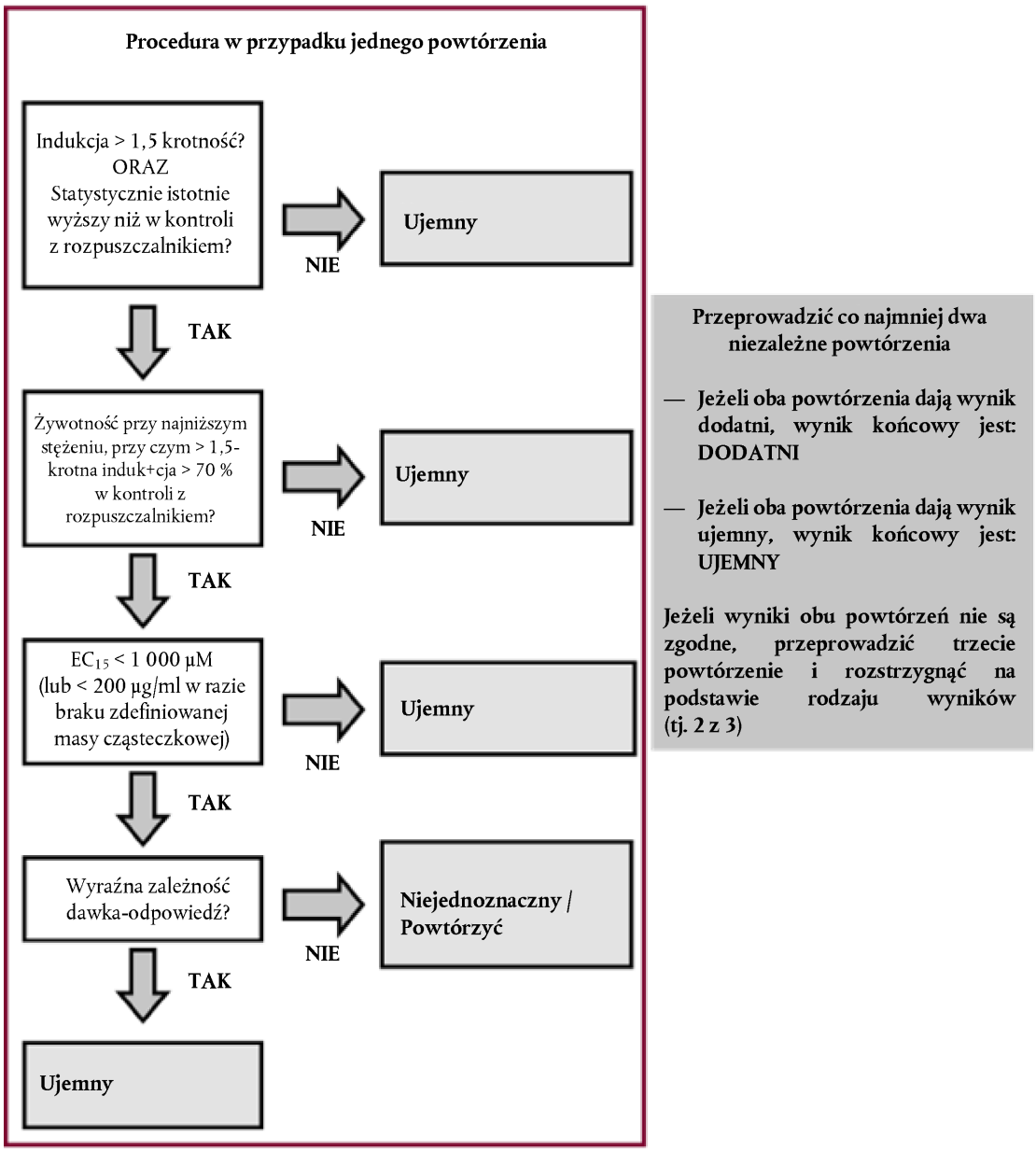
4. można zaobserwować ogólną zależność dawka-odpowiedź w kontekście indukcji lucyferazy (lub reakcji dwufazowej, o której mowa w pkt 33).

▼M7

Jeżeli w ramach danego powtórzenia wszystkie trzy pierwsze warunki zostały spełnione, ale nie można zaobserwować wyraźnej zależności dawka-odpowiedź w kontekście indukcji lucyferazy, wynik powtórzenia należy uznać za niewiążący, co może wiązać się z koniecznością przeprowadzenia dalszych badań (wykres 1). Ponadto wynik ujemny zaobserwowany w przypadku stężeń < 1 000 µM (lub < 200 µg/ml w przypadku badanych substancji chemicznych, dla których nie ustalono masy cząsteczkowej) również powinien zostać uznany za niewiążący (zob. pkt 11).

Wykres 1

Model prognozowania wykorzystywany w badaniu KeratinoSens™. Prognozę KeratinoSens™ należy rozpatrywać w ramach IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 i 11.



W rzadkich przypadkach badane substancje chemiczne, które indukują aktywność lucyferazy na poziomie bardzo zbliżonym do poziomów cytotoksycznych, mogą dawać wynik dodatni w pewnych powtórzeniach na poziomach niecytotoksycznych (tj. $EC_{1,5}$ oznaczające stężenie poniżej (<) IC_{30}), a w innych powtórzeniach

▼M7

tylko na poziomach cytotoksycznych (tj. $EC_{1,5}$ oznaczające stężenie powyżej (>) IC_{30}). Takie badane substancje chemiczne należy powtórnie zbadać, przeprowadzając zawężoną analizę zależności dawka-odpowiedź przy zastosowaniu niższego współczynnika rozcieńczenia (np. 1,33- lub Ö2-(=1,41)krotne rozcieńczenie pomiędzy dołkami), aby określić, czy nastąpiła indukcja na poziomach cytotoksycznych (9).

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— Substancja jednoskładnikowa

  — dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

  — wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;

  — czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

  — postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

  — badane stężenie(-a);

  — warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie.

— Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina:

  — opisana w miarę możliwości np. poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, przedstawienie informacji dotyczących występowania ilościowego oraz wskazanie istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej);

  — wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;

  — masa cząsteczkowa lub pozorna masa cząsteczkowa w przypadku mieszanin lub polimerów o znanym składzie lub inne informacje istotne dla przebiegu badania;

  — postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

  — badane stężenie(-a);

  — warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie.

Kontrole

— Kontrola dodatnia

  — dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

  — wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie i w stosownych przypadkach;

  — czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

  — postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

  — badane stężenie(-a);

  — warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie;

▼M7

— odniesienie do wyników historycznych kontroli dodatnich wykazuje odpowiednie kryteria dopuszczalności serii, w stosownych przypadkach.

— Kontrola ujemna (z nośnikiem)

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS lub inne identyfikatory;

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— wygląd fizyczny, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne w przypadku stosowania kontroli ujemnych/nośników innych niż te opisane w niniejszej metodzie badawczej, w dostępnym zakresie;

— warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie;

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Warunki metody badawczej

— nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań;

— opis zastosowanej metody badawczej;

— zastosowana linia komórkowa, warunki jej przechowywania oraz źródło (np. placówka, z której je otrzymano);

— liczba pasaży i poziom konfluencji komórek wykorzystanych do badania;

— metoda zliczania komórek zastosowana do osadzania przed badaniem i środki podjęte w celu zapewnienia rozmieszczenia jednorodnej liczby komórek (por. pkt 20);

— zastosowany luminometr (np. model), w tym ustawienia przyrządu, wykorzystany substrat lucyferazy oraz wykazanie odpowiednich pomiarów luminescencji w oparciu o badanie kontrolne opisane w dodatku 3;

— procedura stosowana w celu wykazania biegłości laboratorium w zakresie przeprowadzania metody badawczej (tj. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości) lub do wykazania odtwarzalnego przeprowadzania metody badawczej w miarę upływu czasu.

Procedura badawcza

— liczba zastosowanych powtórzeń i użytych kontrprób;

— stosowane stężenia badanej substancji chemicznej, procedura podawania badanej substancji chemicznej i czas narażenia (jeżeli są one inne niż zalecane;

— opis zastosowanych kryteriów oceny i podejmowania decyzji;

— opis zastosowanych kryteriów dopuszczalności badania;

— opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej.

Wyniki

— Tabelaryczne zestawienie wartości I_{max}, $EC_{1,5}$ i wartości żywotności (tj. IC_{50}, IC_{30}) uzyskanych w odniesieniu do danej badanej substancji chemicznej i kontroli dodatniej dla każdego powtórzenia, jak również wartości średnich (I_{max}: średnia; $EC_{1,5}$ i wartości żywotności: średnia geometryczna), odchylenia standardowego (SD) obliczonego przy użyciu danych ze wszystkich poszczególnych powtórzeń oraz wskazanie oceny badanej substancji chemicznej według modelu prognozowania;

▼M7

— współczynnik zmienności otrzymany w oparciu o odczyty luminescencji w odniesieniu do kontroli ujemnej dla każdego doświadczenia;

— wykres przedstawiający krzywe dawka-efekt w odniesieniu do indukcji aktywności lucyferazy i żywotności;

— w stosownych przypadkach opis wszelkich innych istotnych obserwacji.

Omówienie wyników

— omówienie wyników uzyskanych za pomocą badania KeratinoSens™;

— uwzględnienie wyników zastosowania metody badawczej w kontekście IATA, jeżeli są dostępne inne odpowiednie informacje.

Wniosek

BIBLIOGRAFIA

(1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2013). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie piąte zmienione, ONZ, Nowy Jork i Genewa 2013. Dostępne na stronie internetowej: 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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 168. OECD, Paryż.

(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, s. 367–485.

(4) Rozdział B.42 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: badanie lokalnych węzłów chłonnych.

(5) Rozdział B.6 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę.

(6) Rozdział B.50 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: badanie lokalnych węzłów chłonnych DA.

(7) Rozdział B.51 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: badanie lokalnych węzłów chłonnych 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, s. 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, s. 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, s. 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), s. 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, s. 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, s. 1337–1352.

(14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 s. Dostępne na stronie internetowej: 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™., 17 s. Dostępne na stronie internetowej: 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 646–657.

(23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. Wytyczne OECD w odniesieniu do badania chemikaliów nr 457. OECD, Paryż.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. Europejskie Centrum ds. Ekotoksykologii i Toksykologii Substancji Chemicznych (sprawozdanie techniczne nr 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, s. 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, s. 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 KeratinoSensTM cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, s. 2225–2232.

(28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 213, OECD, Paryż.

(29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 34. OECD, Paryż, Francja.

(30) NAFTA (Północnoamerykański Układ Wolnego Handlu) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 s. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badawczej a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (29).

Mechanizm wywoływania skutków szkodliwych: sekwencja zdarzeń, począwszy od struktury chemicznej docelowej substancji chemicznej lub grupy podobnych substancji chemicznych poprzez molekularne zdarzenie inicjujące aż do pożądanego wyniku *in vivo* (2).

ARE: element odpowiedzi antyoksydacyjnej (nazywany również EpRE – elementem odpowiedzi elektrofilowej) jest elementem odpowiedzi występującym w obszarze promotora powyżej sekwencji kodującej genu wielu genów cytoprotekcyjnych i II fazy. Podczas aktywacji przez czynnik transkrypcyjny Nfr2 pośredniczy w indukcji transkrypcyjnej tych genów.

Substancja chemiczna: substancja albo mieszanina.

Współczynnik zmienności: miara zmienności wyliczana dla grupy danych dla powtórzeń poprzez podzielenie odchylenia standardowego przez średnią arytmetyczną. Aby przedstawić go w postaci procentowej, można pomnożyć go przez 100.

$EC_{1,5}$: interpolowane stężenie dla 1,5-krotności indukcji lucyferazy.

IC_{30}: stężenie powodujące zmniejszenie żywotności komórek o 30 %.

IC_{50}: stężenie powodujące zmniejszenie żywotności komórek o 50 %.

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub)populacji na taki czynnik.

IATA (zintegrowane podejście do badań i oceny): usystematyzowane podejście stosowane w odniesieniu do identyfikacji zagrożeń (potencjał), charakterystyki zagrożeń (siła oddziaływania) lub oceny bezpieczeństwa (potencjał / siła oddziaływania oraz narażenie) substancji chemicznej lub grupy substancji chemicznych; w ramach tego podejścia w sposób strategiczny integruje się i waży wszystkie istotne dane, które mogą wpłynąć na podjęcie decyzji regulacyjnej dotyczącej potencjalnego zagrożenia, ryzyka lub konieczności podjęcia dalszych ukierunkowanych, a przez to minimalnych badań.

I_{max}: maksymalny współczynnik sygnału aktywności lucyferazy w porównaniu z kontrolą z rozpuszczalnikiem (kontrolą ujemną) mierzony przy dowolnym stężeniu badanej substancji chemicznej.

Keap1: białko związane ECH typu Kelch 1; białko sensorowe, które może regulować aktywność Nrf2. W warunkach nieindukowanych białko sensorowe Keap1 oddziałuje na czynnik transkrypcyjny Nrf2, powodując ubikwitynację i degradację proteolityczną w proteasomie. Kowalencyjna modyfikacja reaktywnych pozostałości cysteiny Keap1 przez drobne cząsteczki mogą powodować dysocjację Nrf2 od Keap1 (8) (10) (11).

▼M7

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z dwóch lub więcej substancji niewchodzących ze sobą w reakcję (1).

Substancja jednoskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

Substancja wieloskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu ≥10 % (w/w) i <80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się poprzez zmieszanie dwóch lub więcej substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

Nrf2: czynnik jądrowy 2 związany z NF-E2 (ang. nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2); czynnik transkrypcyjny biorący udział w mechanizmie odpowiedzi antyoksydacyjnej. Gdy Nrf2 nie jest ubikwitynowany, gromadzi się w cytoplazmie i przemieszcza się do jądra, gdzie łączy się z ARE w obszarze promotora powyżej sekwencji kodującej genu wielu genów cytoprotekcyjnych, inicjując ich transkrypcję (8) (10) (11).

Kontrola dodatnia: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, stopień reakcji dodatniej nie powinien być nadmierny.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badawczej (29).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną (29).

Odtwarzalność: zgodność wyników uzyskanych w wyniku badania tej samej substancji chemicznej przy użyciu tego samego protokołu badania (zob. wiarygodność) (29).

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (29).

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego z wyjątkiem badanej substancji chemicznej, ale z uwzględnieniem stosowanego rozpuszczalnika. Wykorzystywana jest do określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (29).

Substancja: pierwiastki chemiczne i ich związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu (1).

Badana substancja chemiczna: termin „badana substancja chemiczna” jest używany w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania.

▼M7

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (1).

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

Właściwa metoda badawcza: metoda badawcza, którą uznano za wystarczająco istotną i wiarygodną dla danego celu i która opiera się na uzasadnionych naukowo podstawach. Metoda badawcza nie może zostać uznana za właściwą w sensie absolutnym, ale tylko w odniesieniu do określonego celu (29).

▼M7

Dodatek 2

SUBSTANCJE SŁUŻĄCE DO WYKAZANIA BIEGŁOŚCI

Badanie działania uczulającego na skórę *in vitro*: metoda badawcza z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania niniejszej metody badawczej laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo określając prognozę KeratinoSens™ dla 10 substancji służących do wykazania biegłości wskazanych w tabeli 1 oraz określając wartości $EC_{1,5}$ i IC_{50}, które mieszczą się w odpowiednim zakresie odniesienia, dla co najmniej 8 z 10 substancji służących do wykazania biegłości. Substancje służące do wykazania biegłości wybrano w taki sposób, aby odzwierciedlić zakres reakcji na zagrożenia związane z działaniem uczulającym na skórę. Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz dostępnością wysokiej jakości danych *in vitro* uzyskanych w wyniku przeprowadzenia badania KeratinoSens™.

Tabela 1

Zalecane substancje służące do wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do badania KeratinoSens™

Substancje służące do wykazania biegłości	Numer CAS	Stan skupienia	Prognoza in vivo (1)	KeratinoSens™ Prognoza (2)	Zakres odniesienia $EC_{1,5}$ (μM) (3)	Zakres odniesienia IC_{50} (μM) (3)
Izopropanol	67-63-0	Ciecz	Brak działania uczulającego	Ujemny	>1 000	>1 000
Kwas salicylowy	69-72-7	Substancja stała	Brak działania uczulającego	Ujemny	>1 000	>1 000
Kwas mlekowy	50-21-5	Ciecz	Brak działania uczulającego	Ujemny	>1 000	>1 000
Glicerol	56-81-5	Ciecz	Brak działania uczulającego	Ujemny	>1 000	>1 000
Alkohol cynamylowy	104-54-1	Substancja stała	Czynnik uczulający (słaby)	Dodatni	25–175	>1 000
Dimetakrylan glikolu etylenowego	97-90-5	Ciecz	Czynnik uczulający (słaby)	Dodatni	5–125	>500
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Substancja stała	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	Dodatni	25–250	>500
Metylodibromoglutaronitryl	35691-65-7	Substancja stała	Czynnik uczulający (silny)	Dodatni	<20	20–100
Siarczan 4-metyloaminofenolu	55-55-0	Substancja stała	Czynnik uczulający (silny)	Dodatni	<12,5	20–200
2,4-dinitrochlorobenzen	97-00-7	Substancja stała	Czynnik uczulający (wyjątkowo silny)	Dodatni	<12,5	5–20

(1) Prognozy zagrożenia (i siły działania) *in vivo* są oparte na danych z badania LLNA (13). Siłę działania *in vivo* określa się na podstawie kryteriów zaproponowanych przez ECETOC (24).
(2) Prognozę KeratinoSens™ należy rozpatrywać w ramach IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 i 11 niniejszej metody badawczej.
(3) Na podstawie historycznych wartości zaobserwowanych (12).

▼M7

Dodatek 3

KONTROLA JAKOŚCI POMIARÓW LUMINESCENCJI

Podstawowe doświadczenie mające na celu zapewnienie optymalnych pomiarów luminescencji w ramach badania KeratinoSens™

Następujące trzy parametry mają decydujące znaczenie dla zapewnienia uzyskania wiarygodnych wyników badania luminometrem:

— wystarczająca czułość zapewniająca stabilne tło w dołkach kontrolnych;

— brak gradientu na płytce wskutek długiego czasu trwania odczytu; oraz

— brak zanieczyszczenia światłem sąsiednich dołków przez dołki o dużej aktywności.

Przed badaniem zalecane jest zapewnienie odpowiednich pomiarów luminescencji poprzez zbadanie układu płytek kontrolnych zgodnie z poniższym opisem (analiza potrojona).

Układ płytek na potrzeby pierwszego doświadczenia próbnego

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu
B	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu
C	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu
D	**Dimetakrylan glikolu etylenowego 0,98**	**Dimetakrylan glikolu etylenowego 1,95**	**Dimetakrylan glikolu etylenowego 3,9**	**Dimetakrylan glikolu etylenowego 7,8**	**Dimetakrylan glikolu etylenowego 15,6**	**Dimetakrylan glikolu etylenowego 31,25**	**Dimetakrylan glikolu etylenowego 62,5**	**Dimetakrylan glikolu etylenowego 125**	**Dimetakrylan glikolu etylenowego 250**	**Dimetakrylan glikolu etylenowego 500**	**Dimetakrylan glikolu etylenowego 1 000**	**Dimetakrylan glikolu etylenowego 2 000**
E	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu
F	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu
G	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu
H	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	**Aldehyd cynamonowy 4**	**Aldehyd cynamonowy 8**	**Aldehyd cynamonowy 16**	**Aldehyd cynamonowy 32**	**Aldehyd cynamonowy 64**	**Próba ślepa**

EGDMA = dimetakrylan glikolu etylenowego (nr CAS: 97-90-5), silnie indukująca substancja chemiczna

CA = aldehyd cynamonowy, pozytywna chemiczna substancja odniesienia (nr CAS: 104-55-2)

Analiza kontroli jakości powinna wykazać:

— wyraźną zależność dawka-odpowiedź w rzędzie D, z wartością I_{max} >20-krotności tła (w większości przypadków osiągane są wartości I_{max} wynoszące 100–300);

— brak zależności dawka-odpowiedź w rzędach C i E (wartość indukcji nie wyższa niż 1,5, a w idealnych warunkach nie wyższa niż 1,3) wskutek możliwego zanieczyszczenia światłem, w szczególności w sąsiedztwie dołków o dużej aktywności w rzędzie zawierającym dimetakrylan glikolu etylenowego;

— brak statystycznie istotnej różnicy między rzędami A, B, C, E, F i G (tj. brak granientu na płytce); oraz

— zmienność w każdym z rzędów A, B, C, E, F i G oraz w dołkach zawierających sulfotlenek dimetylu w rzędzie H nie powinna przekraczać 20 % (tj. powinno istnieć stabilne tło).

▼M7

B.61. METODA BADANIA PRZECIEKU FLUORESCEINY DO CELÓW IDENTYFIKACJI SUBSTANCJI ŻRĄCYCH I SILNIE DRAŻNIĄCYCH DLA OCZU

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 460 (2012). Metoda badania przecieku fluoresceiny (FL) jest metodą badawczą *in vitro*, którą można stosować w niektórych okolicznościach i przy określonych ograniczeniach w celu zaklasyfikowania substancji chemicznych (substancji i mieszanin) jako substancji żrących i silnie drażniących dla oczu, określonych przez Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ) (kategoria 1), rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (rozporządzenie CLP) ([1]) (kategoria 1) oraz Agencję Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (EPA) (kategoria I) (1)(2). Do celów niniejszej metody badawczej substancje silnie drażniące dla oczu definiuje się jako substancje chemiczne, które powodują uszkodzenie tkanki oka po podaniu badanej substancji chemicznej, nieustępujące w ciągu 21 dni lub powodujące poważne fizyczne pogorszenie widzenia, a substancjami żrącymi dla oczu są substancje chemiczne, które powodują nieodwracalne uszkodzenie tkanki oka. Te substancje chemiczne zostały zaklasyfikowane do kategorii 1 wg GHS ONZ, kategorii 1 wg unijnego rozporządzenia CLP lub kategorii I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

Chociaż uważa się, że metoda badawcza FL nie może całkowicie zastąpić badania na oku królika *in vivo*, zaleca się jej stosowanie w ramach zintegrowanej strategii badań do celów regulacyjnej klasyfikacji i oznakowania. Metoda badawcza FL jest zatem zalecana jako wstępny etap w ramach podejścia odgórnego do identyfikacji substancji żrących/silnie drażniących dla oczu, szczególnie w przypadku ograniczonych rodzajów substancji chemicznych (tj. substancji i mieszanin rozpuszczalnych w wodzie) (3)(4).

Obecnie powszechnie uznaje się, że w dającej się przewidzieć przyszłości żaden pojedynczy test działania drażniącego na oko *in vitro* nie będzie w stanie zastąpić testu działania drażniącego na oko *in vivo* (metoda badawcza B.5 (5)) do celów prognozowania pełnego zakresu działania drażniącego różnych klas chemicznych. Strategiczne połączenia kilku alternatywnych metod badawczych w ramach (zintegrowanej) strategii badań mogą jednak być w stanie zastąpić test działania drażniącego na oczy *in vivo* (4). Podejście odgórne (4) ma w założeniu być stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna będzie miała wysoki potencjał działania drażniącego.

W oparciu o model prognozowania opisany szczegółowo w pkt 35 metoda badawcza FL pozwala zidentyfikować substancje chemiczne w ograniczonej dziedzinie zastosowania jako substancje żrące/silnie drażniące dla oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ; kategoria 1 wg unijnego rozporządzenia CLP; kategoria I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych) bez konieczności przeprowadzania dalszych badań. To samo zakłada się w odniesieniu do mieszanin, chociaż mieszanin nie używano w walidacji. Metodę badawczą FL można zatem wykorzystywać w celu ustalenia działania drażniącego/żrącego substancji chemicznych dla oczu zgodnie ze strategią badań sekwencyjnych metody badawczej B.5 (5). Substancja chemiczna, w odniesieniu do której w ramach metody badawczej FL nie przewiduje się, żeby była żrąca lub silnie drażniąca dla oczu, musiałaby jednak zostać przebadana przy użyciu co najmniej jednej dodatkowej metody badawczej (*in vitro* lub *in vivo*), która umożliwia dokładną identyfikację (i) substancji chemicznych, które są substancjami żrącymi/silnie drażniącymi

([1]) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

▼M7

dla oczu dającymi w badaniu FL wynik fałszywie ujemny *in vitro* (kategoria 1 wg GHS ONZ; kategoria 1 wg unijnego rozporządzenia CLP; kategoria I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych); (ii) substancji chemicznych, które nie są sklasyfikowane jako substancje żrące/drażniące dla oczu (brak kategorii wg GHS ONZ; brak kategorii wg unijnego rozporządzenia CLP; kategoria IV wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych), lub (iii) substancji chemicznych, które są substancjami umiarkowanie/delikatnie drażniącymi dla oczu (kategorie 2A i 2B wg GHS ONZ; kategoria 2 wg unijnego rozporządzenia CLP; kategorie II i III wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych).

Niniejsza metoda badawcza ma na celu opisanie procedur stosowanych do oceny potencjalnego działania żrącego lub silnie drażniącego badanej substancji chemicznej na oczy, określanego na podstawie potencjału powodowania przez tę substancję uszkodzenia nieprzepuszczalnej zlewającej się jednowarstwowej hodowli komórek. Spójność przepuszczalności przeznabłonkowej jest główną funkcją nabłonka występującego w spojówce i rogówce. Przepuszczalność przeznabłonkowa jest kontrolowana przez różne połączenia ścisłe. Wykazano, że wzrost przepuszczalności nabłonka rogówki *in vivo* powiązany jest ze stopniem nasilenia stanu zapalnego i uszkodzenia powierzchniowego obserwowanym wraz z rozwojem podrażnienia oczu.

W metodzie badawczej FL efekty toksyczne po krótkim czasie narażenia na działanie badanej substancji chemicznej są mierzone na podstawie wzrostu przepuszczalności soli sodowej fluoresceiny przez jednowarstwową hodowlę komórek nabłonka psiej nerki Madin-Darby'ego (MDCK) na przepuszczalnych insertach. Wielkość przecieku fluoresceiny, który występuje, jest proporcjonalna do uszkodzenia połączeń ścisłych, połączeń desmosomalnych i błon komórkowych wywołanego przez substancję chemiczną. Może być wykorzystana do oszacowania potencjału toksyczności badanej substancji chemicznej dla oczu. W dodatku 1 znajduje się schemat przedstawiający hodowlę komórek MDCK na membranie insertu do celów metody badawczej FL.

Definicje znajdują się w dodatku 2.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

Niniejsza metoda badawcza opiera się na protokole nr 71 INVITTOX (6), który został oceniony w ramach międzynarodowego badania walidacyjnego przez Europejskie Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM) przy udziale Międzyagencyjnego Komitetu Koordynacyjnego ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) i Japońskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (JaCVAM).

Metoda badawcza FL nie jest zalecana do celów identyfikacji substancji chemicznych, które powinny być sklasyfikowane jako umiarkowanie/delikatnie drażniące, lub substancji chemicznych (substancji i mieszanin), których nie należy sklasyfikować jako drażniących dla oczu (tj. kategoria 2A/2B i brak kategorii wg GHS; kategoria 2 i brak kategorii wg unijnego rozporządzenia CLP; kategoria II/III/IV wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych), jak wynika z badania walidacyjnego (3) (7).

Ta metoda badawcza ma zastosowanie wyłącznie do badania substancji chemicznych rozpuszczalnych w wodzie (substancji i mieszanin). Metoda badawcza FL na ogół daje dokładną prognozę potencjału działania silnie drażniącego na oczy w przypadku substancji chemicznych, które są rozpuszczalne w wodzie, lub w przypadku gdy rozcieńczenie nie ma wpływu na efekt toksyczny (7). Aby można było substancję chemiczną zaliczyć do substancji rozpuszczalnych w wodzie, w warunkach doświadczalnych substancja ta powinna być rozpuszczalna w sterylnym zbuforowanym roztworze soli Hanksa, zawierającym wapń (w stężeniu 1,0–1,8 mM) i niezawierającym czerwieni fenolowej, w stężeniu ≥ 250 mg/ml (jedna dawka powyżej wartości granicznej wynoszącej 100 mg/ml). Jeżeli badana substancja chemiczna jest rozpuszczalna w stężeniu poniżej 100 mg/ml, ale przy tym stężeniu już wywołuje przeciek fluoresceiny na poziomie 20 % (tj. FL_{20} < 100 mg/ml), nadal jednak można ją zaklasyfikować do kategorii I wg GHS lub kategorii I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

Zidentyfikowane ograniczenia niniejszej metody badawczej powodują, że z dziedziny zastosowania wykluczone są mocne kwasy i zasady, utrwalacze komórek i wysoce lotne substancje chemiczne. Te substancje chemiczne charakteryzują się mechanizmami, które nie są mierzone w ramach metody badawczej FL, np. znaczną koagulacją, zmydlaniem lub szczególnymi właściwościami chemicznymi

▼M7

pod względem reagowania. Inne zidentyfikowane ograniczenia tej metody są oparte na wynikach dotyczących zdolności predykcyjnej w odniesieniu do barwionych i lepkich badanych substancji chemicznych (7). Wyniki te wskazują na to, że oba te rodzaje substancji chemicznych są trudne do usunięcia z jednowarstwowej hodowli komórek po krótkim okresie narażenia i że zdolność predykcyjną tej metody badawczej można byłoby poprawić, gdyby zastosowano większą liczbę etapów przemywania. Stałe substancje chemiczne zawieszone w cieczy mają tendencję do wytrącania się, a stężenie końcowe oddziałujące na komórki może być trudne do ustalenia. Jeżeli z bazy danych wykluczy się substancje należące do tych klas chemicznych i fizycznych, dokładność badania FL w systemach klasyfikacji UE, Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych i GHS znacznie się poprawia (7).

Ze względu na cel niniejszej metody badawczej (tj. zidentyfikowanie wyłącznie substancji żrących/silnie drażniących dla oczu) odsetek wyników fałszywie ujemnych (zob. pkt 13) nie ma decydującego znaczenia, ponieważ takie substancje chemiczne zostaną następnie zbadane za pomocą innych odpowiednio zweryfikowanych badań *in vitro* lub na królikach, w zależności od wymogów regulacyjnych, przy zastosowaniu testów sekwencyjnych zgodnie z podejściem opartym na analizie wagi dowodów (5) (zob. również pkt 3 i 4).

Inne zidentyfikowane ograniczenia metody badawczej FL oparte są na odsetkach wyników fałszywie ujemnych i fałszywie dodatnich. W przypadku wykorzystania metody badawczej FL jako etapu wstępnego w ramach podejścia odgórnego do identyfikacji rozpuszczalnych w wodzie substancji i mieszanin żrących/silnie drażniących dla oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ; kategoria 1 wg unijnego rozporządzenia CLP; kategoria I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych), odsetek wyników fałszywie dodatnich uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej FL wynosił od 7 % (7/103; GHS ONZ i unijne rozporządzenie CLP) do 9 % (9/99; Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych), a odsetek wyników fałszywie ujemnych wynosił od 54 % (15/28; Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych) do 56 % (27/48; GHS ONZ i unijne rozporządzenie CLP) w porównaniu z wynikami *in vivo*. W niniejszym dokumencie nie określono grup chemicznych dających wyniki fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemne w ramach metody badawczej FL.

Z kulturą komórkową MDCK wiążą się pewne specyficzne ograniczenia techniczne. Połączenia ścisłe, które blokują przechodzenie barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny przez jednowarstwową hodowlę komórek, są coraz słabsze wraz ze wzrostem liczby pasaży komórek. Niepełne tworzenie się połączeń ścisłych prowadzi do większego przecieku fluoresceiny w próbie kontrolnej niepoddanej działaniu substancji chemicznej. Istotny jest zatem określony dopuszczalny przeciek maksymalny w próbach kontrolnych niepoddanych działaniu substancji chemicznej (zob. pkt 38: przeciek na poziomie 0 %). Podobnie jak w przypadku badań *in vitro*, komórki mogą z czasem ulec przekształceniu, a zatem konieczne jest określenie przedziałów liczby pasaży na potrzeby badań.

Obecna dziedzina zastosowania może zostać poszerzona w niektórych przypadkach, ale wyłącznie po przeanalizowaniu rozszerzonego zbioru danych dotyczących badanych substancji chemicznych, najlepiej uzyskanych w drodze badań (3). Niniejsza metoda badawcza będzie aktualizowana odpowiednio w miarę uwzględniania nowych informacji i danych.

W każdym laboratorium zaczynającym przeprowadzanie tego badania należy zastosować substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości wymienione w dodatku 3. Laboratoria mogą stosować te substancje chemiczne w celu wykazania swojej biegłości technicznej w zakresie przeprowadzania metody badawczej FL przed przedstawieniem danych z badania FL do celów regulacyjnej klasyfikacji zagrożeń.

ZASADA BADANIA

Metoda badawcza FL jest badaniem opartym na cytotoksyczności i funkcji komórek *in vitro* przeprowadzanym na zlewającej się jednowarstwowej hodowli rurkowatych komórek nabłonkowych MDCK CB997, które są hodowane na półprzepuszczalnych insertach i stanowią model stanu nierozmnażającego się nabłonka rogówki *in vivo*. Linia komórkowa MDCK jest linią sprawdzoną, która tworzy połączenia ścisłe i desmosomalne podobnych do tych, które znajdują się na stronie szczytowej nabłonka spojówki i rogówki. Połączenia ścisłe i desmosomalne *in vivo* zapobiegają penetracji nabłonka rogówki przez substancje rozpuszczone i materiały obce. Utrata nieprzepuszczalności przeznabłonkowej wskutek uszkodzenia połączeń ścisłych i desmosomalnych jest jednym z pierwszych etapów podrażnienia oczu wywołanego przez substancję chemiczną.

▼M7

Badana substancja chemiczna nanoszona jest na zlewającą się warstwę komórek hodowanych na stronie szczytowej insertu. W celu odzwierciedlenia normalnego klirensu w odniesieniu do narażenia ludzi zwykle stosuje się krótki, jednominutowy okres narażenia. Zaletą krótkiego okresu narażenia jest to, że substancje i mieszaniny na bazie wody można badać w postaci czystej, jeżeli można je łatwo usunąć po upływie okresu narażenia. Pozwala to na dokonanie bardziej bezpośrednich porównań wyników z wpływem danej substancji chemicznej na ludzi. Następnie badaną substancję chemiczną usuwa się, a na stronę szczytową jednowarstwowej hodowli komórek nanosi się na 30 minut barwnik na bazie soli sodowej fluoresceiny o wysokiej fluorescencji. Uszkodzenie połączeń ścisłych spowodowane badaną substancją chemiczną ustala się na podstawie ilości fluoresceiny, która przecieka przez warstwę komórek w określonym czasie.

Ilość barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny, która przechodzi przez jednowarstwową hodowlę komórek i membranę insertu do określonej objętości roztworu znajdującego się w dołku (do którego przecieka barwnik na bazie soli sodowej fluoresceiny), ustala się poprzez pomiar stężenia fluoresceiny w dołku metodą spektrofluorymetryczną. Ilość przecieku fluoresceiny (FL) oblicza się poprzez odniesienie do odczytów intensywności fluorescencji (FI) z dwóch prób kontrolnych: próby ślepej oraz próby kontrolnej z maksymalnym przeciekiem. Wartość procentowa przecieku i w związku z tym wielkość uszkodzenia połączeń ścisłych wyrażana jest względem tych prób kontrolnych w odniesieniu do każdego z określonych stężeń badanej substancji chemicznej. Następnie oblicza się FL_{20} (tj. stężenie, które powoduje 20-procentowy FL względem wartości odnotowanej w odniesieniu do zlewającej się jednowarstwowej hodowli komórek niepoddanej działaniu substancji chemicznej oraz insertów niezawierających komórek). Wartość FL_{20} (mg/ml) wykorzystuje się w modelu prognozowania do celów identyfikacji substancji żrących i silnie drażniących dla oczu (zob. pkt 35).

Ustanie działania substancji stanowi ważną część profilu toksyczności badanej substancji chemicznej, którą to część również ocenia się metodą badania drażniącego działania na oczy *in vivo*. Wstępne analizy wykazywały, że dane dotyczące ustania działania substancji (do 72 h po narażeniu na działanie substancji chemicznej) mogłyby zwiększać zdolność predykcyjną protokołu 71 INVITTOX, lecz potrzebna jest dalsza ocena, do której przydatne byłyby dodatkowe dane, najlepiej uzyskane w drodze dalszych badań (6). Niniejsza metoda badawcza będzie aktualizowana odpowiednio w miarę uwzględniania nowych informacji i danych.

PROCEDURA

Przygotowanie jednowarstwowej hodowli komórek

Przygotowuje się jednowarstwową hodowlę komórek MDCK CB 997 przy użyciu częściowo zlewających się komórek rosnących w kolbach do kultury komórkowej w pożywce DMEM/Nutrient Mix F12 (1x koncentrat z L-glutaminą, 15 mM buforu HEPES, wapń (w stężeniu 1,0–1,8 mM) i 10 % inaktywowanego ciepłem FCS/FBS). Co istotne, wszystkie pożywki/roztwory używane w badaniu FL powinny zawierać wapń w stężeniu od 1,8 mM (200 mg/l) do 1,0 mM (111 mg/l), aby zapewnić tworzenie się połączeń ścisłych i ich spójność. Należy kontrolować przedział liczby pasaży komórek, aby zapewnić równomierne i powtarzalne tworzenie się połączeń ścisłych. Najlepiej byłoby, gdyby komórki znajdowały się w przedziale pasażu wynoszącym 3–30 od rozmrożenia, ponieważ komórki w tym przedziale pasażu mają podobną funkcję, co ułatwia zapewnienie odtwarzalności wyników badania.

Przed przeprowadzeniem metody badawczej FL komórki odkleja się od kolby poprzez trypsynizację i odwirowuje się, po czym odpowiednią ilość komórek wysiewa się na insertach umieszczonych w płytkach 24-dołkowych (zob. dodatek 1). Do posiewu komórek należy użyć insertów o średnicy 12 mm z membraną z mieszanych estrów celulozy o grubości 80–150 μm i wielkości porów równej 0,45 μm. W badaniu walidacyjnym użyto insertów Millicell-HA o średnicy 12 mm. Parametry insertu i typ membrany są ważne, ponieważ mogą mieć wpływ na wzrost komórek i wiązanie się substancji chemicznej. Niektóre rodzaje substancji chemicznych mogą wiązać się z membraną insertu Millicell-HA, co mogłoby wpływać na interpretację wyników. W celu wykazania równoważności należy zastosować substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości (zob. dodatek 3), jeżeli stosowane są inne membrany.

▼M7

Wiązanie się substancji chemicznej z membraną insertu częściej ma miejsce w przypadku kationowych substancji chemicznych, takich jak chlorek benzalkoniowy, które są przyciągane do naładowanej membrany (7). Wiązanie się substancji chemicznej z membraną insertu może wydłużyć okres narażenia na działanie danej substancji chemicznej, co prowadzi do zawyżenia oceny potencjalnej toksyczności tej substancji chemicznej, ale może również powodować fizyczne ograniczenie przecieku fluoresceiny przez insert poprzez związanie się barwnika z kationowym wiązaniem chemicznym z membraną insertu, co prowadzi do zaniżenia oceny potencjalnej toksyczności tej substancji chemicznej. Można to łatwo monitorować poprzez narażenie samej membrany na maksymalne stężenie badanej substancji chemicznej, a następnie dodanie barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny w normalnym stężeniu na standardowy czas (bez próby kontrolnej komórek). Jeżeli dochodzi do wiązania się barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny, po zmyciu materiału badanego membrana insertu jest żółta. Znajomość właściwości wiązania się badanej substancji chemicznej jest zatem niezbędna do interpretowania wpływu substancji chemicznej na komórki.

Posiew komórek na insertach powinien dać zlewającą się jednowarstwową hodowlę komórek w momencie narażenia na działanie substancji chemicznej. Na każdy insert należy dodać $1{,}6 \times 10^5$ komórek (400 µl zawiesiny komórek o gęstości 4×10^5 komórek/ml). W tych warunkach zlewająca się jednowarstwowa hodowla komórek uzyskiwana jest zwykle po 96 godzinach hodowli. Przed posiewem inserty należy poddać kontroli wzrokowej w celu zapewnienia, aby przyczyną wszelkich uszkodzeń odnotowanych podczas kontroli wzrokowej opisanej w pkt 30 była obróbka.

Kultury komórkowe MDCK należy trzymać w inkubatorach w wilgotnym środowisku o zawartości CO_2 wynoszącej 5 % ± 1 % oraz temperaturze 37 ± 1 °C. Komórki nie powinny być skażony bakteriami, wirusami, mykoplazmą ani grzybami.

Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej

Na potrzeby każdej serii doświadczenia należy przygotować świeży roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej i wykorzystać go w ciągu 30 minut od przygotowania Badaną substancję chemiczną należy przygotować w zbuforowanym roztworze soli Hanksa z dodatkiem wapnia (w stężeniu 1,0–1,8 mM) niezawierającym czerwieni fenolowej, aby uniknąć wiązania białek surowicy krwi. Przed przystąpieniem do badania należy ocenić rozpuszczalność substancji chemicznej przy stężeniu 250 mg/ml w zbuforowanym roztworze soli Hanksa. Jeżeli przy tym stężeniu substancja chemiczna tworzy stabilną zawiesinę lub emulsję (tzn. jest jednorodna i nie osiada ani nie rozdziela się na więcej faz niż jedna) przez 30 minut, można dalej wykorzystywać zbuforowany roztwór soli Hanksa jako rozpuszczalnik. Jeżeli jednak zostanie stwierdzone, że substancja chemiczna w takim stężeniu jest nierozpuszczalna w zbuforowanym roztworze soli Hanksa, należy rozważyć zastosowanie innych metod badawczych zamiast badania przecieku fluoresceiny (metoda FL). W przypadkach, w których zostanie stwierdzone, że substancja chemiczna jest nierozpuszczalna w zbuforowanym roztworze soli Hanksa, należy z ostrożnością podchodzić do zastosowania lekkiego oleju mineralnego charakterze rozpuszczalnika, ponieważ nie są dostępne wystarczające dane, które pozwoliłyby na wyciągnięcie wniosków na temat skuteczności badania FL w takich warunkach.

Wszystkie substancje chemiczne przeznaczone do badania przygotowuje się w pięciu stałych stężeniach rozcieńczonych w stosunku masowo-objętościowym w sterylnym zbuforowanym roztworze soli Hanksa uzyskanym z roztworu podstawowego, zawierającym wapń (w stężeniu 1,0–1,8 mM) i niezawierającym czerwieni fenolowej: 1, 25, 100, 250 mg/ml oraz czysty lub nasycony roztwór. W przypadku badania substancji chemicznej w stanie stałym należy uwzględnić bardzo wysokie stężenie wynoszące 750 mg/ml. W przypadku poddawania komórek działaniu roztworu substancji chemicznej o tak wysokim stężeniu konieczne może być zastosowanie pipety typu D. Jeżeli zostanie stwierdzone, że stężenie toksyczne mieści się w granicach 25–100 mg/ml, należy dwukrotnie zbadać oddziaływanie następujących dodatkowych stężeń: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Z tych stężeń należy wyprowadzić wartość FL_{20}, pod warunkiem że zostały spełnione kryteria dopuszczalności.

Badane substancje chemiczne wprowadza się do zlewających się jednowarstwowych hodowli komórek po usunięciu podłoża do hodowli komórkowych i dwukrotnym przemyciu sterylnym, ciepłym (37 °C) zbuforowanym roztworem soli Hanksa z dodatkiem wapnia (w stężeniu 1,0–1,8 mM) niezawierającym czerwieni fenolowej. Poprzednio filtry zostały podane kontroli wzrokowej pod kątem wcześniejszych uszkodzeń, które mogłyby zostać błędnie przypisane potencjalnym niezgodnościom z badanymi substancjami chemicznymi. Należy

▼M7

zastosować co najmniej trzy kontrpróby w odniesieniu do każdego stężenia badanej substancji chemicznej i na potrzeby prób kontrolnych w każdej serii badań. Po upływie 1 minuty narażenia w temperaturze pokojowej substancję chemiczną należy starannie usunąć przez aspirację, dwukrotnie przemyć jednowarstwową hodowlę komórek sterylnym, ciepłym (37 °C) zbuforowanym roztworem soli Hanksa z dodatkiem wapnia (w stężeniu 1,0–1,8 mM) niezawierającym czerwieni fenolowej, i natychmiast zmierzyć przeciek fluoresceiny.

W każdej serii badania należy zastosować jednoczesną kontrolę ujemną (NC) i jednoczesną kontrolę dodatnią (PC), aby wykazać, że spójność jednowarstwowej hodowli komórek (NC) i czułość komórek (PC) mieszczą się w akceptowanym zakresie zdefiniowanym na podstawie danych historycznych. Proponowaną substancją chemiczną służącą do kontroli dodatniej jest Brij 35 (CAS nr 9002-92-0) w stężeniu 100 mg/ml. Przy takim stężeniu powinno się uzyskać przeciek fluoresceiny wynoszący w przybliżeniu 30 % (dopuszczalny zakres wynosi 20–40 % przecieku fluoresceiny, tzn. uszkodzenie warstwy komórek). Proponowaną substancją chemiczną służącą do kontroli ujemnej jest zbuforowany roztwór soli Hanksa z dodatkiem wapnia (w stężeniu 1,0–1,8 mM) niezawierający czerwieni fenolowej (niepoddana działaniu substancji ślepa próba kontrolna). Każda seria badań powinna również obejmować kontrolę maksymalnego przecieku, aby można było obliczyć wartości FL_{20}. Maksymalny przeciek ustala się za pomocą insertu kontrolnego bez komórek.

Oznaczanie przepuszczalności fluoresceiny

Bezzwłocznie po usunięciu badanej i kontrolnej substancji chemicznej dodaje się do insertów (np. Millicel-HA) 400 µl roztworu soli sodowej fluoresceiny o stężeniu 0,1 mg/ml (0,01 % (w/v) w zbuforowanym roztworze soli Hanksa z dodatkiem wapnia [w stężeniu 1,0–1,8 mM] niezawierającym czerwieni fenolowej). Kultury pozostawia się na 30 minut w temperaturze pokojowej. Pod koniec inkubacji z fluoresceiną inserty ostrożnie usuwa się z każdego dołka. Każdy filtr poddaje się kontroli wzrokowej i odnotowuje się wszelkie uszkodzenia, jakie mogły nastąpić podczas obróbki.

Ilość fluoresceiny, która przeciekła przez jednowarstwową hodowlę komórek i insert, określa się ilościowo w roztworze, który pozostał w dołkach po usunięciu insertów. Pomiarów dokonuje się za pomocą spektrofluorymetru przy wzbudzeniu i emisji fal o długości odpowiednio 485 nm i 530 nm. Czułość spektrofluorymetru powinna być ustawiona w taki sposób, aby różnica liczbowa między maksymalna wartością FL (insert bez komórek) i minimalną wartością FL (insert ze zlewającą się jednowarstwową hodowlą komórek z kontrolą ujemną) była największa. Ze względu na różnice w stosowanym spektrofluorymetrze proponuje się, aby ustawić czułość dającą intensywność fluorescencji > 4 000 przy kontroli maksymalnego przecieku fluoresceiny. Maksymalna wartość FL nie powinna przekraczać 9 999. Maksymalna intensywność przecieku fluorescencji powinna mieścić się w granicach linowego zakresu użytego do badania spektrofluorymetru.

Interpretacja wyników i model prognozowania

Wielkość FL jest proporcjonalna do uszkodzenia połączeń ścisłych wywołanego przez substancję chemiczną. Wyrażony procentowo FL w odniesieniu do każdego badanego stężenia substancji chemicznej oblicza się na podstawie wartości FL uzyskanych w odniesieniu do badanej substancji chemicznej w stosunku do wartości FL z kontroli ujemnej (odczyt dla zlewającej się jednowarstwowej hodowli komórek poddanej działaniu substancji służącej do kontroli ujemnej) i kontroli maksymalnego przecieku (odczyt ilości FL z insertu bez komórek).

Średnia maksymalna intensywność fluorescencji przecieku = x

Średnia wartość intensywności fluorescencji przecieku 0 % (kontrola ujemna) = y

Średni przeciek o wartości 100 % uzyskuje się, odejmując średni przeciek o wartości 0 % od średniego maksymalnego przecieku.

tzn. x – y = z

Procentowy przeciek w odniesieniu do każdej stałej dawki uzyskuje się, odejmując przeciek o wartości 0 % od średniej intensywności fluorescencji z odczytów dla trzech kontrprób (m) i dzieląc tę wartość przez przeciek o wartości 100 %, tj. % FL – [(m-y) / z] × 100 %, gdzie:

▼M7

M = średnia intensywność fluorescencji z trzech pomiarów kontrpróby w odniesieniu do danego stężenia,

% FL = odsetek fluoresceiny, która przecieka przez warstwę komórek.

Do obliczenia stężenia substancji chemicznej powodującego 20-procentowy FL należy użyć poniższego równania:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

gdzie:

D = % inhibicji

A = % uszkodzenia (20-procentowy przeciek fluoresceiny)

B = % przecieku fluoresceiny < A

C = % przecieku fluoresceiny > A

M_C = Stężenie C (mg/ml)

M_C = Stężenie B (mg/ml)

Wartość graniczna FL_{20} na potrzeby przewidywania, które substancje chemiczne są substancjami żrącymi / silnie drażniącymi dla oczu, jest podana poniżej:

FL_{20} (mg/ml)	C&L wg GHS ONZ	C&L wg unijnego rozporządzenia CLP	C&L wg amerykańskiej agencji EPA
≤100	Kategoria 1	Kategoria 1	Kategoria I

C&L: klasyfikacja i oznakowanie

Zaleca się stosowanie metody badawczej FL wyłącznie do celów identyfikacji substancji żrących i silnie drażniących dla oczu rozpuszczalnych w wodzie (kategoria 1 wg GHS ONZ, kategoria 1 wg unijnego rozporządzenia CLP, kategoria I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych) (zob. pkt 1 i 10).

W celu zidentyfikowania substancji chemicznych rozpuszczalnych w wodzie (substancji i mieszanin) (3) (6) (7) jako „powodujące poważne uszkodzenie oczu” (kategoria 1 wg GHS ONZ / unijnego rozporządzenia CLP) lub jako „żrące lub silnie drażniące dla oczu” (kategoria I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych) badana substancja chemiczna powinna indukować wartość $FL_{20} \leq 100$ mg/ml.

Dopuszczenie wyników

Średnia wartość maksymalnego przecieku fluoresceiny (x) powinna przekraczać 4 000 (zob. pkt 31), średni przeciek o wartości 0 % powinien być równy lub niższy niż 300, a średni przeciek o wartości 100 % (z) powinien mieścić się w granicach od 3 700 do 6 000.

Badanie uznaje się za dopuszczalne, jeżeli w kontroli dodatniej uzyskano uszkodzenie warstwy komórek w przedziale 20–40 % (miara jako odsetek przecieku fluoresceiny).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

W odniesieniu do każdej serii badania dane uzyskane z poszczególnych dołków z kontrpróbą (np. wartości intensywności fluorescencji i obliczone procentowe dane FL w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, łącznie z klasyfikacją) należy podać w postaci tabeli. Ponadto należy zgłosić średnie ± odchylenia standardowe dla pomiarów poszczególnych kontrprób w każdej serii badań.

▼M7

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badane i kontrolne substancje chemiczne

— nazwa systematyczna (nazwy systematyczne), np. nazwa strukturalna używana przez Chemical Abstracts Service (CAS), po której następują inne nazwy, jeżeli są znane;

— numer CAS substancji chemicznej, jeżeli jest znany;

— czystość i skład substancji lub mieszaniny (jako wartość procentowa masy), w zakresie, w jakim te informacje są dostępne;

— właściwości fizykochemiczne istotne dla przebiegu badania, np. stan skupienia, lotność, pH, stabilność, rozpuszczalność w wodzie, klasa chemiczna);

— postępowanie z badaną/kontrolną substancja chemiczną przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— warunki przechowywania.

Uzasadnienie zastosowanej metody badawczej i protokołu

— należy wziąć pod uwagę względy związane z dziedziną zastosowania i ograniczenia metody badawczej.

Warunki badania

— opis zastosowanego układu komórek, w tym certyfikat autentyczności i stan linii komórkowej pod względem mykoplazmy;

— szczegółowe dane na temat zastosowanej procedury badawczej;

— zastosowane stężenia badanej substancji chemicznej;

— czas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej;

— czas inkubacji z fluoresceiną;

— opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej;

— opis zastosowanych kryteriów oceny;

— odniesienie do danych historycznych dotyczących modelu (np. kontrole ujemne i dodatnie, w stosownych przypadkach substancje odniesienia);

— informacje na temat biegłości technicznej wykazanej przez laboratorium.

Wyniki

— tabelaryczne zestawienie danych uzyskanych w odniesieniu do poszczególnych badanych substancji chemicznych i prób kontrolnych w każdej serii badań i dla każdego pomiaru kontrpróby (w tym poszczególne wyniki, średnie i odchylenia standardowe);

— ustalone na tej podstawie klasyfikacje z odniesieniem do modelu prognozowania lub zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji;

— opis innych zaobserwowanych skutków.

▼M7

Omówienie wyników

— powinno obejmować kwestie dotyczące niejednoznacznego rezultatu (pkt 35: FL_{20} > 100 mg/ml) i dalszych badań.

Wnioski

BIBLIOGRAFIA

(1) ONZ (2009), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie trzecie zmienione, Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostępne na stronie internetowej: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (1996). Label Review Manual: wyd. II. EPA737-B-96-001. Waszyngton D.C.: Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

(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, s. 1–9.

(5) Rozdział B.5 niniejszego załącznika, *Działanie żrące / silnie drażniące na oczy*.

(6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Włochy: Europejskie Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM). Dostępne na stronie internetowej: [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.

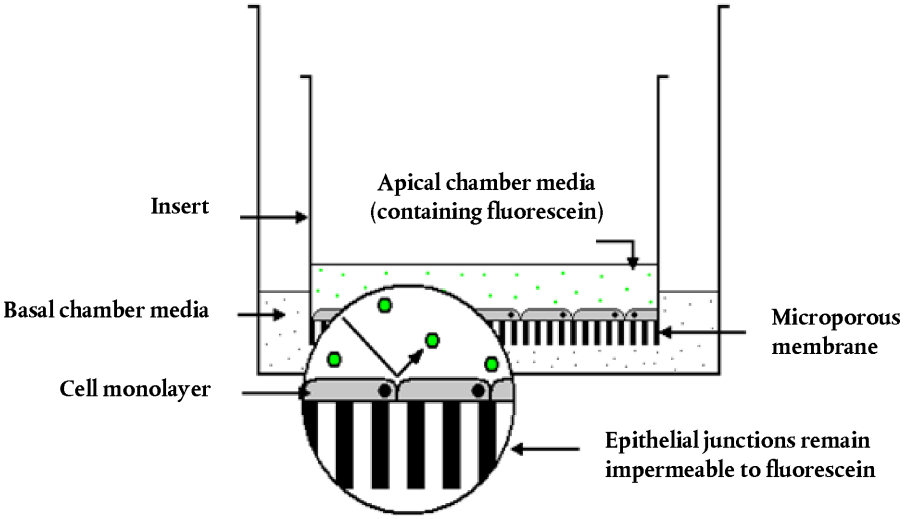
(8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 34. OECD, Paryż.

▼M7

Dodatek 1

SCHEMAT PRZEDSTAWIAJĄCY HODOWLĘ KOMÓREK MDCK NA MEMBRANIE INSERTU DO CELÓW METODY BADAWCZEJ FL

Zlewająca się warstwa komórek MDCK jest hodowana na półprzepuszczalnej membranie insertu. Inserty umieszcza się w dołkach 24-dołkowych płytek.



Rysunek zaczerpnięto z: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, praca doktorska, Uniwersytet Nottingham, Zjednoczone Królestwo.

▼M7

Dodatek 2

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badawczej a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej.

Substancja chemiczna: substancja albo mieszanina.

Kategoria I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (EPA): substancje chemiczne, które powodują poważne uszkodzenie oka (nieodwracalne uszkodzenie tkanki oka) lub zmiany rogówkowe lub podrażnienie rogówki utrzymujące się dłużej niż 21 dni (2).

Unijne rozporządzenie CLP (rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin): wdraża w Unii Europejskiej (UE) system GHS ONZ służący do klasyfikacji chemikaliów (substancji i mieszanin).

Odsetek wyników fałszywie ujemnych: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik ujemny. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

Odsetek wyników fałszywie dodatnich: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik dodatni. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

$\mathbf{FL_{20}}$: może być oszacowana na podstawie oznaczenia stężenia, przy którym badana substancja chemiczna powoduje przeciek 20 % fluoresceiny przez warstwę komórek.

Przeciek fluoresceiny: ilość fluoresceiny przechodząca przez warstwę komórek i zmierzona metodą spektrofluorymetryczną.

GHS (Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ)): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich działań niepożądanych w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska.

Kategoria 1 wg GHS: uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie jest w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu.

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do negatywnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub)populacji na taki czynnik.

Mieszanina: pojęcie użyte w kontekście GHS ONZ oznacza mieszaninę lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji niewchodzących ze sobą w reakcję.

Kontrola ujemna: kontrpróba niepoddana działaniu badanej substancji chemicznej zawierająca wszystkie składniki układu badawczego. Próbka ta jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji chemicznej oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia, czy rozpuszczalnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

▼M7

Niezaklasyfikowane: substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane jako należące do kategorii 1, 2A lub 2B wg GHS ONZ; kategorie 1 lub 2 wg unijnego rozporządzenia CLP; lub kategorie I, II lub III substancji drażniących dla oczu wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

Substancja żrąca dla oczu: a) substancja chemiczna powodująca nieodwracalne uszkodzenie tkanki oka; b) substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane do kategorii 1 wg GHS ONZ; kategoria 1 wg unijnego rozporządzenia CLP; lub kategoria I substancji drażniących dla oczu wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

Substancja drażniąca dla oczu: a) substancja chemiczna, która powoduje odwracalną zmianę w oku w następstwie jej wprowadzenia na przednią powierzchnię oka; b) substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane do kategorii 2A lub 2B wg GHS ONZ; kategoria 2 wg unijnego rozporządzenia CLP; lub kategorie II lub III substancji drażniących dla oczu wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

Substancja silnie drażniąca dla oczu: a) substancja chemiczna powodująca uszkodzenie tkanki oka w następstwie jej wprowadzenia na przednią powierzchnię oka, które nie ustępuje w ciągu 21 dni od podania, lub powodująca poważne fizyczne pogorszenie widzenia; b) substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane do kategorii 1 wg GHS ONZ; kategoria 1 wg unijnego rozporządzenia CLP; lub kategoria I substancji drażniących dla oczu wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

Kontrola dodatnia: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w pozytywnej próbie kontrolnej w czasie, stopień reakcji dodatniej nie powinien być skrajnie duży.

Substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości: podzbiór substancji z listy substancji chemicznych odniesienia, który początkujące laboratorium może wykorzystać w celu wykazania biegłości w odniesieniu do zweryfikowanej referencyjnej metody badawczej.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć oczekiwany skutek biologiczny. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badawczej (8).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną.

Badanie zastępcze: badanie, które ma na celu zastąpienie badania stosowanego rutynowo i zaakceptowanego do identyfikacji zagrożeń lub oceny ryzyka i w odniesieniu do którego ustalono, że w porównaniu do zaakceptowanego badania zapewnia odpowiednio równoważną lub lepszą ochronę zdrowia ludzi lub zwierząt lub środowiska we wszystkich możliwych warunkach badania i w odniesieniu do wszystkich możliwych substancji chemicznych.

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (8).

Poważne uszkodzenie oczu: uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu**.**

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, w tym rozpuszczalnik lub nośnik, która jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia

▼M7

wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku lub nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą ujemną próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik lub nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (8).

Substancja: termin używany w kontekście GHS ONZ oznacza pierwiastki chemiczne i ich związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Wielopoziomowa strategia badań: strategia badań sekwencyjnych, w ramach której wszystkie istniejące informacje na temat badanej substancji chemicznej są analizowane na każdym poziomie w określonym porządku z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia, przed przejściem do następnego poziomu. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji chemicznej potencjał w zakresie wywołania podrażnienia, dodatkowe badania nie są wymagane. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji nie można przypisać badanej substancji chemicznej potencjału w zakresie wywołania podrażnień, przeprowadza się procedurę badań sekwencyjnych na zwierzętach do momentu, w którym będzie można dokonać jednoznacznej klasyfikacji.

Zweryfikowana metoda badawcza: metoda badawcza, w odniesieniu do której zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zweryfikowana metoda badawcza może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu (8).

Waga dowodów: proces analizowania mocnych i słabych stron różnych informacji podczas formułowania wniosku dotyczącego potencjalnego zagrożenia stwarzanego przez daną substancję chemiczną oraz uzasadnienia takiego wniosku.

▼M7

Dodatek 3

SUBSTANCJE CHEMICZNE PRZEZNACZONE DO OCENY BIEGŁOŚCI W ODNIESIENIU DO METODY BADAWCZEJ FL

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania niniejszej metody badawczej laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo ustalając klasyfikację 8 substancji chemicznych wskazanych w tabeli 1 pod względem działania żrącego na oczy. Wspomniane substancje chemiczne zostały dobrane w taki sposób, by reprezentowały zakres reakcji na miejscowe działanie drażniące/żrące na oczy oparty na wynikach badania na oku królika *in vivo* (wytyczna TG 405, metoda badawcza B.5 (5)) (tj. kategorie 1, 2A, 2B lub brak klasyfikacji zgodnie z GHS ONZ). Biorąc jednak pod uwagę zweryfikowaną użyteczność badania FL (tj. wyłącznie do identyfikowania substancji żrących/silnie drażniących dla oczu), istnieją tylko dwa rezultaty badania na potrzeby klasyfikacji (substancja żrąca/silnie drażniąca albo substancja niewykazująca działania żrącego/silnie drażniącego) do celów wykazania biegłości. Przy wyborze substancji chemicznej kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz istnieniem wysokiej jakości danych uzyskanych dzięki zastosowaniu metody badawczej FL. Z tego względu substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości zostały wybrane na podstawie dokumentu „Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing" (8), który został wykorzystany do retrospektywnej walidacji metody badawczej FL.

Tabela 1

Substancje chemiczne do zalecane wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do metody badawczej FL

Substancja chemiczna	Nr CAS	Klasa chemiczna ([1])	Stan skupienia	Klasyfikacja *in vivo* ([2])	Klasyfikacja *in vitro* ([3])
Chlorek benzalkoniowy (5 %)	8001-54-5	Związek oniowy	Ciecz	Kategoria 1	Substancja żrąca/silnie drażniąca dla oczu
Chlorowodorek prometazyny	58-33-3	Amina/amidyna, heterocykliczny organiczny związek siarki	Substancja stała	Kategoria 1	Substancja żrąca/silnie drażniąca dla oczu
Wodorotlenek sodu (10 %)	1310-73-2	Zasada	Ciecz	Kategoria 1	Substancja żrąca/silnie drażniąca dla oczu
Laurylosiarczan sodu (15 %)	151-21-3	Kwas karboksylowy (sól)	Ciecz	Kategoria 1	Substancja żrąca/silnie drażniąca dla oczu
kwas 1,4-benzenodikarboksylowy	619-66-9	Kwas karboksylowy, aldehyd	Substancja stała	Kategoria 2(A)	Substancja niepowodująca poważnego uszkodzenie oka / substancja o słabym działaniu drażniącym
Azotan amonu	6484-52-2	Sól nieorganiczna	Substancja stała	Kategoria 2(A)	Substancja niewykazująca działania żrącego/silnie drażniącego na oczy
2-metyloacetylooctan etylu	609-14-3	Keton, ester	Ciecz	Kategoria 2(B)	Substancja niewykazująca działania żrącego/silnie drażniącego na oczy
Glicerol	56-81-5	Alkohol	Ciecz	Brak kategorii	Substancja niewykazująca działania żrącego/silnie drażniącego na oczy

Skróty: Nr CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service.

([1]) Klasy chemiczne przypisano do każdej badanej substancji chemicznej, wykorzystując standardowy schemat klasyfikacji oparty o system klasyfikacji Medical Subject Headings (MeSH), opracowany przez National Library of Medicine (dostępny pod adresem http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Na podstawie wyników badania na oku królika *in vivo* (wytyczna OECD TG 405, metoda badawcza B.5) i z zastosowaniem GHS ONZ oraz unijnego rozporządzenia CLP.

([3]) Na podstawie wyników badania FL (protokół nr 71(6) INVITTOX)

▼M7

B.62. **TEST KOMETOWY NA SSAKACH W ŚRODOWISKU ZASADOWYM *IN VIVO***

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 489 (2016). Test kometowy *in vivo* w środowiskach zasadowych (elektroforeza żelowa pojedynczych komórek) (dalej nazywany po prostu testem kometowym) jest wykorzystywany do wykrywania pęknięć łańcuchów DNA w komórkach lub jądrach komórkowych wyizolowanych z różnych tkanek zwierzęcych, zazwyczaj gryzoni, poddanych działaniu materiałów potencjalnie genotoksycznych. Test kometowy został poddany przeglądowi i różne grupy ekspertów opublikowały zalecenia (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Niniejsza metoda badawcza stanowi część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. Opracowany został dokument OECD, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd ostatnich zmian, jakie wprowadzono do wytycznych dotyczących badań (11).

Celem testu kometowego jest identyfikacja substancji chemicznych powodujących uszkodzenia DNA. W środowisku zasadowym (>pH 13) test kometowy umożliwia wykrycie jednoniciowych i dwuniciowych pęknięć, spowodowanych na przykład bezpośrednim wzajemnym oddziaływaniem DNA, miejsc nietrwałych w środowisku zasadowym lub na skutek przejściowych pęknięć łańcucha DNA wynikających z procesu naprawy odciętego łańcucha DNA. Wspomniane pęknięcia łańcucha mogą zostać naprawione bez trwałej szkody dla komórki, mogą być śmiertelne dla komórki lub mogą się utrwalić w postaci mutacji prowadzącej do trwałej realnej zmiany. Mogą też prowadzić do aberracji chromosomowej, co wiąże się również z wieloma chorobami ludzkimi, w tym z rakiem.

Formalna próba walidacji testu kometowego *in vivo* na gryzoniach została dokonana w latach 2006–2012 i była koordynowana przez Japońskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (JaCVAM) we współpracy z Europejskim Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM), Międzyagencyjnym Komitetem Koordynacyjnym ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) oraz NTP Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych (NICEATM) (12). Niniejsza metoda badawcza obejmuje zalecane stosowanie i ograniczenia testu kometowego i jest oparta na końcowym protokole (12) wykorzystanym w próbie walidacyjnej, a także na dodatkowych stosownych opublikowanych i niepublikowanych (stanowiących własność laboratoriów) danych.

Definicje kluczowych terminów zamieszczono w dodatku 1. Należy zauważyć, że do celów tego testu można korzystać z wielu różnych narzędzi (szkiełek mikroskopowych, krążków żelowych, płytek 96-dołkowych itd.) Dla ułatwienia w dalszej części niniejszego dokumentu stosowane będzie pojęcie „szkiełko mikroskopowe”, które obejmuje wszystkie inne narzędzia.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

Test kometowy stanowi metodę pomiaru pęknięć nici łańcucha DNA w komórkach eukariotycznych. Pojedyncze komórki/jądra zatopione w agarozie na szkiełku mikroskopowym poddaje się lizie za pomocą detergentu i roztworu o dużym stężeniu soli. Na tym etapie lizy błony komórki i jądra zostają zniszczone, co umożliwia uwolnienie DNA zwiniętego w pętle zwane ogólnie nukleoidami oraz fragmentów DNA. Elektroforeza w środowisku o wysokim pH prowadzi do powstawania struktur podobnych do komet, które, po zastosowaniu odpowiednich barwników fluorescencyjnych, można obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym. Fragmenty DNA migrują od „głowy” do „ogona” w zależności od ich rozmiaru, przy czym „intensywność” ogona komety w stosunku od intensywności całkowitej (głowa plus ogon) odzwierciedla poziom uszkodzenia DNA (13) (14) (15).

Test kometowy w środowisku zasadowym *in vivo* ma szczególne znaczenie dla oceny zagrożenia genotoksycznego ze względu na to, że reakcje występujące w trakcie badania są uzależnione od wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania *in vivo*, a także od procesu naprawy DNA. Wspomniane procesy mogą przebiegać w różny sposób w zależności od gatunku, tkanki i rodzaju uszkodzenia DNA.

▼M7

Aby spełnić wymogi w zakresie dobrostanu zwierząt, w szczególności ograniczenia wykorzystania zwierząt (zasada 3R od ang. *replacement, reduction, refinement*, czyli zastąpienie, ograniczenie, udoskonalenie), przedmiotowy test można również łączyć z innymi badaniami toksykologicznymi, np. badaniami toksyczności dawki powtórzonej (10) (16) (17), lub punkt końcowy można łączyć z innymi punktami końcowymi genotoksyczności, takimi jak test mikrojądrowy na erytrocytach ssaków *in vivo* (18) (19) (20). Test kometowy najczęściej przeprowadza się na gryzoniach, chociaż wykorzystuje się w nim także inne gatunki ssaków i gatunki niezaliczane do ssaków. Wykorzystanie gatunków niebędących gryzoniami powinno być naukowo i etycznie uzasadnione w poszczególnych przypadkach, przy czym zdecydowanie zaleca się, aby test kometowy był przeprowadzany na gatunkach innych niż gryzonie tylko w ramach innego badania toksyczności, a nie jako samodzielny test.

Wyboru drogi narażenia i badanych tkanek należy dokonać na podstawie całej dostępnej/istniejącej wiedzy na temat badanych substancji chemicznych, np. zamierzonej/przewidywanej drogi narażenia człowieka, metabolizmu i dystrybucji, potencjału pod względem skutków w miejscu kontaktu, ostrzeżeń strukturalnych, innych danych dotyczących genotoksyczności lub toksyczności, oraz biorąc pod uwagę cel badania. Zatem w stosownych przypadkach można badać potencjał genotoksyczny badanych substancji chemicznych na tkankach docelowych pod kątem rakotwórczości lub innych efektów toksycznych. Badanie uważa się również za przydatne do celów dalszego badania genotoksyczności stwierdzonej w układzie *in vitro*. Stosowne jest wykonane testu kometowego *in vivo* na tkance będącej przedmiotem zainteresowania, w przypadku gdy można zasadnie oczekiwać, że badana tkanka będzie odpowiednio narażona.

Test został poddany walidacji w najszerszym zakresie w odniesieniu do tkanek somatycznych samców szczurów w trakcie międzylaboratoryjnych badań porównawczych, takich jak próba JaCVAM (12) i badanie opisane przez Rothfussa *et al.*, 2010 (10). W próbie międzynarodowej walidacji JaCVAM wykorzystano tkanki wątroby i żołądka. Wybrano wątrobę, ponieważ jest to organ biorący najaktywniejszy udział w procesach metabolizmu substancji chemicznych, a także często docelowy organ narażony na rakotwórcze działanie tych substancji. Wybór tkanek żołądka wynikał stąd, że jest to pierwsze miejsce zetknięcia się substancji chemicznych po narażeniu doustnym, jakkolwiek należałoby również uwzględnić inne obszary przewodu pokarmowego, takie jak dwunastnica i jelito czcze, będące miejscami kontaktu, a w przypadku ludzi można je uznać za istotniejsze niż gruczołowy żołądek gryzoni. Należy zapewnić, aby takie tkanki nie były narażone na zbyt wysokie stężenia badanej substancji chemicznej (21). Technika ta ma w zasadzie zastosowanie do każdej tkanki, z której można pozyskać nadającą się do analizy zawiesinę z pojedynczą komórką lub pojedynczym jądrem komórkowym. Dane stanowiące własność wielu laboratoriów wykazują pomyślne zastosowanie tej techniki w odniesieniu do wielu różnych tkanek i istnieje wiele publikacji przedstawiających możliwość stosowania tej techniki w stosunku do organów lub tkanek innych niż wątroba i żołądek, np. jelito czcze (22), nerki (23) (24), skóra (25) (26) lub pęcherz moczowy (27) (28), komórki płuc i z płukania oskrzelowo-płucnego (istotne w przypadku badań nad wdychanymi substancjami chemicznymi) (29) (30), a także przeprowadzone zostały badania na wielu różnych organach (31) (32).

Chociaż może istnieć zainteresowanie efektami genotoksycznymi w komórkach germinalnych, należy zwrócić uwagę, że standardowy test kometowy w środowisku zasadowym, taki jak opisano w niniejszej metodzie badawczej, nie jest uznawany za odpowiedni do pomiaru pęknięć łańcucha DNA w dojrzałych komórkach germinalnych. Ponieważ w literaturze dotyczącej stosowania testu kometowego pod kątem genotoksyczności w odniesieniu do komórek germinalnych (33) zgłoszono wysokie i zmienne poziomy tła uszkodzeń DNA, wydaje się, że konieczne jest wprowadzenie modyfikacji do protokołu wraz z ulepszoną standaryzacją i badaniami walidacyjnymi, zanim można będzie włączyć test kometowy na dojrzałych komórkach germinalnych (np. spermie) do metody badawczej. Ponadto zalecany schemat narażenia opisany w niniejszej metodzie badawczej nie jest optymalny i konieczne byłyby dłuższe okresy narażenia lub pobierania próbek dla celów uzyskania wymiernej analizy pęknięć łańcucha DNA w dojrzałej spermie. Efekty genotoksyczne zmierzone za pomocą testu kometowego w komórkach jąder na różnych etapach różnicowania zostały opisane w pozycjach (34) (35) bibliografii. Należy jednak zwrócić uwagę ze gonady zawierają mieszaninę komórek somatycznych i germinalnych. Z tego względu wyniki dodatnie w całej gonadzie (jądrze) niekoniecznie odzwierciedlają uszkodzenia komórek germinalnych; wskazują one jednak, że badana substancja chemiczna lub badane substancje chemiczne bądź produkty ich metabolizmu dotarły do gonady.

▼M7

Nie można w sposób wiarygodny wykryć usieciowania w standardowych warunkach doświadczalnych testu kometowego. W pewnych zmodyfikowanych warunkach doświadczalnych można wykryć wzajemne powiązania DNA–DNA i DNA–białka, a także można wykryć inne modyfikacje zasadowe, takie jak utlenione zasady (23) (36) (37) (38) (39). Potrzebne byłyby jednak dalsze prace w celu wystarczającego scharakteryzowania niezbędnych zmian w protokole. Zatem wykrycie związków sieciujących nie stanowi podstawowego celu opisanego tu testu. Test ten nie jest właściwy, nawet po wprowadzeniu zmian, do wykrywania aneugenów.

Ze względu na bieżący stan wiedzy występuje szereg dodatkowych ograniczeń (zob. dodatek 3) związanych z testem kometowym *in vivo*. Należy oczekiwać, że niniejsza metoda badawcza zostanie w przyszłości zweryfikowana i w razie potrzeby zmieniona w świetle zdobytych doświadczeń.

Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się nad tym, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

ZASADA METODY

Zwierzęta poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej z zastosowaniem odpowiedniej drogi narażenia. Szczegółowy opis dawkowania i pobierania próbek jest podany w pkt 36–40. W wybranych okresach pobierania próbek wycina się tkanki będące przedmiotem zainteresowania i przygotowuje się zawiesiny z pojedynczych komórek/jąder (jeżeli zostanie to uznane za przydatne, można wykonać perfuzję *in situ*, np. wątroby) i zatapia w miękkim agarze w celu unieruchomienia ich na szkiełkach mikroskopowych. Komórki/jądra poddaje się działaniu buforu do przeprowadzania lizy w celu usunięcia błony komórkowej lub błony jądra i wystawia na działanie silnej zasady, np. pH $\geq$ 13, aby spowodować rozwinięcie się łańcucha DNA i uwolnienie rozwiniętych pętli i fragmentów DNA. DNA jądrowy zatopiony w agarze jest następnie poddawany elektroforezie. Normalne molekuły DNA, które nie uległy fragmentacji, pozostają w miejscu, w którym DNA jądrowy został zatopiony w agarze, natomiast pęknięte fragmenty DNA i uwolnione pętle DNA będą migrowały w kierunku anody. Po zakończeniu elektroforezy uwidacznia się DNA z zastosowaniem odpowiedniego barwnika fluorescencyjnego. Preparaty należy analizować za pomocą mikroskopu i w pełni lub częściowo zautomatyzowanych systemów analizy obrazu. Stopień migracji DNA w trakcie elektroforezy i zasięg migracji odzwierciedlają ilość i wielkość fragmentów DNA. Test kometowy ma szereg punktów końcowych. Zaleca się ocenę uszkodzeń DNA na podstawie zawartości DNA w ogonie (procentowa zawartość DNA w ogonie lub procentowa intensywność ogona) (12) (40) (41) (42). Po przeanalizowaniu wystarczającej liczby jąder uzyskane dane analizuje się przy użyciu odpowiednich metod w celu oceny wyników testu.

Należy zwrócić uwagę, że zbadano wpływ zmiany różnych aspektów metodologii, w tym sposobu przygotowania próbki, warunków przebiegu elektroforezy, parametrów analizy wizualnej (np. intensywności zabarwienia, światłość żarówki mikroskopu oraz stosowania filtrów mikroskopowych i dynamiki aparatu fotograficznego) oraz warunków otoczenia (np. podświetlenie), i stwierdzono, że mogą one zakłócać migrację DNA (43) (44) (45) (46).

WERYFIKACJA BIEGŁOŚCI LABORATORIUM

Każde laboratorium powinno ustalić swoje kompetencje laboratoryjne w odniesieniu do testu kometowego, wykazując zdolność do uzyskania zawiesin pojedynczych komórek lub jąder o wystarczającej jakości z każdej tkanki docelowej każdego wykorzystywanego do badań gatunku. Jakość preparatów będzie oceniana w pierwszej kolejności na podstawie procentowej zawartości DNA w ogonie w odniesieniu do zwierząt poddanych działaniu nośnika w odtwarzalnym niskim zakresie. Z obecnie dostępnych danych wynika, że najlepiej byłoby, gdyby średnia grupowa procentowej zawartości DNA w ogonie (na podstawie średniej median – szczegóły tych warunków można znaleźć w pkt 57) w wątrobie szczura nie przekraczała 6 %, co byłoby spójne z wartościami uzyskanymi w próbie walidacyjnej JaCVAM (12) i innymi opublikowanymi i stanowiącymi własność laboratoriów danymi. Obecnie nie istnieją wystarczające

▼M7

dane, aby sformułować zalecenia dotyczące optymalnych lub dopuszczalnych zakresów dla innych tkanek. Nie wyklucza to stosowania innych tkanek w uzasadnionych przypadkach. Sprawozdanie z badania powinno zawierać odpowiedni przegląd efektywności testu kometowego prowadzonego na tych tkankach w porównaniu z opublikowana literaturą lub danymi stanowiącymi własność laboratoriów. Po pierwsze, pożądany jest niski zakres procentowej zawartości DNA w ogonie w próbach kontrolnych, aby zapewniony został dostateczny zakres oznaczania umożliwiający wykrycie efektu dodatniego. Po drugie, każde laboratorium powinno być w stanie odtworzyć przewidywane reakcje w przypadku mutagenów bezpośrednich i mutagenów pośrednich, wykorzystując różne tryby postępowania zgodnie z propozycjami zawartymi w tabeli 1 (pkt 29).

W stosownych przypadkach można wybrać substancje dające wynik dodatni, na przykład z próby walidacyjnej JaCVAM (12) lub innych opublikowanych danych (zob. pkt 9), wraz z podaniem uzasadnienia, w celu wykazania wyraźnych reakcji dodatnich w badanych tkankach. Należy również wykazać zdolność do wykrywania słabych efektów znanych mutagenów, np. metanosulfonian etylu w niskich dawkach, na przykład ustalając zależność dawka-odpowiedź za pomocą odpowiedniej liczby dawek podawanych w odpowiednich odstępach czasu. W pierwszej kolejności należy skoncentrować się na ustaleniu biegłości w odniesieniu do najczęściej wykorzystywanych tkanek, np. wątroby gryzoni, w przypadku których można dokonać porównań z istniejącymi danymi i oczekiwanymi wynikami (12). Jednocześnie można gromadzić dane pozyskiwane z innych tkanek, np. żołądka/dwunastnicy/jelita czczego, krwi itd. Laboratorium musi wykazać biegłość w odniesieniu do wszystkich poszczególnych tkanek każdego gatunku, które zamierza badać, i będzie musiało wykazać, że można uzyskać z danej tkanki dopuszczalną reakcję dodatnią ze znanym mutagenem (np. metanosulfonianem etylu).

Należy gromadzić dane dotyczące kontroli z nośnikiem / kontroli ujemnej, aby wykazać odtwarzalność danych dotyczących reakcji ujemnych i aby zagwarantować, że techniczne aspekty testu były prawidłowo kontrolowane, lub aby zasugerować konieczność ponownego ustalenia zakresów danych historycznych dotyczących kontroli (zob. pkt 22).

Należy zwrócić uwagę, że chociaż wiele tkanek można pobrać w trakcie sekcji zwłok i przygotować do testu kometowego, laboratorium musi wykazywać biegłość w pobieraniu wielu tkanek od jednego zwierzęcia, zapewniając tym samym, że nie zostaną utracone żadne potencjalne zmiany patologiczne DNA i test kometowy nie zostanie zakłócony. Czas, jaki upływa od uśmiercenia zwierzęcia do pobrania tkanek do testu, może mieć decydujące znaczenie (zob. pkt 44).

W toku rozwijania biegłości w wykonywaniu tego testu należy mieć na uwadze dobrostan zwierząt, w związku z tym można wykorzystywać tkanki zwierząt użytych do innych badań w trakcie rozwijania kompetencji w zakresie różnych aspektów testu. Ponadto przeprowadzenie pełnego badania w trakcie etapów wprowadzania nowej metody badawczej w laboratorium może okazać się niepotrzebne i w związku z tym, rozwijając niezbędne umiejętności, można użyć mniejszej liczby zwierząt lub badanych stężeń.

Dane historyczne dotyczące kontroli

W toku badania biegłości laboratorium powinno stworzyć bazę danych historycznych w celu ustalenia zakresów i rozkładów wyników kontroli dodatniej i ujemnej dla odpowiednich tkanek i gatunków. Zalecenia dotyczące sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych (tj. kryteria włączania danych do zbioru danych historycznych i wykluczania danych z tego zbioru oraz kryteria dopuszczalności dla danego doświadczenia) można znaleźć w literaturze (47). Różne tkanki i różne gatunki, a także różne nośniki i drogi podawania, mogą prowadzić do różnych wartości procentowej zawartości DNA w ogonie w kontroli ujemnej. W związku z tym istotne jest, aby ustalić zakresy wyników kontroli ujemnej dla każdej tkanki i każdego gatunku. Laboratoria powinny

▼M7

stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (48)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest „pod kontrolą”. Konieczna może być również optymalizacja wyboru odpowiednich substancji służących do kontroli dodatniej, zakresów dawek i warunków doświadczalnych (np. warunków elektroforezy) na potrzeby wykrywania słabych efektów (zob. pkt 17).

Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem ich spójności z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wszelkie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli.

OPIS METODY

Przygotowania

Wybór gatunku zwierząt

Zazwyczaj wykorzystuje się popularne laboratoryjne szczepy zdrowych, młodych, dorosłych gryzoni (w wieku 6–10 tygodni na początku podawania substancji toksycznej, chociaż dopuszcza się również używanie nieco starszych zwierząt). Wybór gatunku gryzoni powinien odbywać się na podstawie (i) gatunku użytego w innych badaniach toksyczności (aby można było skorelować dane i umożliwić badania łączone), (ii) gatunku, u którego rozwinęły się guzy w badaniu działania rakotwórczego (w przypadku badania mechanizmu rakotwórczego) lub (iii) gatunków, których metabolizm ma największe znaczenie dla ludzi, jeżeli jest znany. Zazwyczaj w tym badaniu wykorzystywane są szczury. Można jednak użyć innego gatunku, jeżeli jest to uzasadnione z etycznego i naukowego punktu widzenia.

Warunki utrzymywania i karmienia

W przypadku gryzoni temperatura w pomieszczeniu ze zwierzętami doświadczalnymi powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Najlepiej byłoby, gdyby wilgotność względna wynosiła 50–60 %, przy czym powinna wynosić co najmniej 30 % i najlepiej byłoby, gdyby nie przekraczała 70 % poza okresami czyszczenia pomieszczenia. Oświetlenie powinno być sztuczne z zachowaniem cyklu 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne oraz należy zapewnić zwierzętom nieograniczony dostęp do wody do picia. Wybór paszy może zależeć od potrzeby zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej, jeżeli jest ona podawana tą drogą. Gryzonie należy trzymać w małych grupach (nie więcej niż pięć sztuk) składających się ze zwierząt tej samej płci, jeżeli nie przewiduje się, że mogłoby dojść do agresywnego zachowania Zwierzęta można utrzymywać pojedynczo tylko wtedy, gdy ma to uzasadnienie naukowe. Jeśli to tylko możliwe, należy stosować pełne podłogi, ponieważ podłogi z siatki mogą powodować poważne obrażenia (49). Należy zapewnić urozmaicenie warunków bytowania.

Przygotowanie zwierząt

Należy losowo przydzielić zwierzęta do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu badanej substancji. Zwierzęta zostają indywidualnie oznakowane i aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez co najmniej 5 dni, zanim zostaną poddane działaniu badanej substancji. W celu indywidualnego oznakowania zwierząt należy stosować najmniej inwazyjna metodę. Właściwe metody obejmują obrączkowanie, kolczykowanie, wszczepianie mikroukładów i identyfikację biometryczną. Znakowanie przez przycinanie palców u nóg i uszu nie jest naukowo uzasadnione w przypadku tych badań. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać ± 20 %.

Przygotowanie dawek

Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuszczać lub przygotowywać w postaci zawiesiny w odpowiednich nośnikach lub dodawać do paszy lub wody do picia przed podaniem dawki zwierzętom. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym mogą być dawkowane bezpośrednio lub można je rozcieńczać przed dawkowaniem. W przypadku narażenia inhalacyjnego badane substancje chemiczne można podawać w postaci gazu, pary lub stałych/ciekłych aerozoli, w zależności od ich właściwości fizykochemicznych (50) (51).

Należy stosować świeże preparaty badanej substancji chemicznej, chyba że z danych dotyczących stabilności wynika, iż przechowywanie tych preparatów jest dopuszczalne, i chyba że w danych tych określono warunki prawidłowego przechowywania takich preparatów.

▼M7

Warunki badania

Nośnik

Nośnik w stosowanych objętościach dawek nie powinien wywoływać efektów toksycznych oraz nie powinno istnieć ryzyko, że wejdzie on w reakcję chemiczną z badanymi substancjami chemicznymi. Jeśli wykorzystywane są inne niż dobrze znane nośniki, ich włączenie do doświadczenia powinno być poparte danymi wskazującymi ich zgodność pod względem zwierząt doświadczalnych, drogi podawania i punktu końcowego. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć zastosowanie wodnego rozpuszczalnika/nośnika. Należy zwrócić uwagę, że niektóre nośniki (zwłaszcza nośniki o lepkiej konsystencji) mogą powodować stan zapalny i podwyższone poziomy pęknięć łańcucha DNA w miejscu kontaktu, w szczególności w przypadku wielokrotnego podawania.

Kontrole

Kontrole dodatnie

Na tym etapie do każdego badania należy zazwyczaj dołączyć grupę co najmniej 3 nadających się do poddania analizie zwierząt jednej płci lub każdej płci, jeżeli wykorzystuje się zwierzęta obu płci (zob. pkt 32), której to grupie podaje się substancję służącą do kontroli dodatniej. W przyszłości może to dać możliwość wykazania odpowiedniej biegłości w celu zmniejszenia zapotrzebowania na próby kontrolne dodatnie. W przypadku wielokrotnego pobierania próbek (np. w przypadku protokołu z jednorazowym podaniem) konieczne jest jedynie włącznie kontroli dodatniej przy jednym z pobrań próbek, należy jednak zapewnić zrównoważony plan doświadczenia (zob. pkt 48). Nie ma konieczności podawania substancji służących do jednoczesnej kontroli dodatniej tą samą drogą, którą podano badaną substancję chemiczną, chociaż istotne jest, aby zastosować tę samą drogę podawania w przypadku pomiaru efektów w miejscu kontaktu. Należy wykazać, że substancje służące do kontroli dodatniej indukują pęknięcia łańcuchów DNA we wszystkich tkankach będących przedmiotem zainteresowania w przypadku badanej substancji chemicznej, w związku z czym prawdopodobnie najlepszy wybór stanowi metanosulfonian etylu, ponieważ powodował pęknięcia łańcucha DAN we wszystkich badanych tkankach. Dawki substancji służących do kontroli dodatniej należy dobrać w taki sposób, aby wywoływały umiarkowane efekty, które pozwalają na krytyczną ocenę efektywności i czułości badania, i aby można było je oprzeć na krzywej dawka-efekt ustalonej przez laboratorium w toku wykazywania biegłości. Procentowa zawartość DNA w ogonie u zwierząt służących do jednoczesnej kontroli dodatniej powinna być spójna z ustalonym wcześniej przez laboratorium zakresem w odniesieniu do poszczególnych tkanek i okresu pobierania próbek od tego gatunku (zob. pkt 16). Przykładowe substancje służące do kontroli dodatniej i niektóre z tkanek docelowych (u gryzoni) dla tych substancji są przedstawione w tabeli 1. Substancje inne niż wymienione w tabeli 1 można wybrać, jeżeli jest to uzasadnione naukowo.

Tabela 1

Przykładowe substancje służące do kontroli dodatniej i niektóre z tkanek docelowych dla tych substancji

Substancje i nry CAS
Metanosulfonian etylu (nr CAS 62-50-0) dla każdej tkanki
Etylonitrozomocznik (nr CAS 759-73-9) dla wątroby i żołądka, dwunastnicy lub jelita czczego
Metanosulfonian metylu (nr CAS 66-27-3) dla wątroby, żołądka, dwunastnicy lub jelita czczego, komórek płuc i z płukania oskrzelowo-płucnego, nerek, pęcherza moczowego, płuc, jąder i szpiku kostnego/krwi
N-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyna (nr CAS:70-25-7) w odniesieniu do żołądka, dwunastnicy lub jelita czczego
1,2-dimetylohydrazyna 2HCl (CAS RN 306-37-6) dla wątroby i jelita
N-metylo-*N*-nitrozomocznik (nr CAS 684-93-5) dla wątroby, szpiku kostnego, krwi, nerek, żołądka, jelita czczego i mózgu.

▼M7

Kontrole ujemne

Do każdego badania w odniesieniu do każdego okresu pobierania próbek i każdej tkanki należy włączyć grupę zwierząt służących do kontroli ujemnej, którym podawany jest sam nośnik, a poza tym traktowanych w taki sam sposób jak grupy poddawane działaniu substancji. Procentowa zawartość DNA w ogonie u zwierząt służących do kontroli ujemnej powinna mieścić się w granicach ustalonego wcześniej przez laboratorium zakresu w odniesieniu do poszczególnych tkanek i okresu pobierania próbek od tego gatunku (zob. pkt 16). W przypadku braku historycznych lub opublikowanych danych dotyczących kontroli wskazujących, że wybrany nośnik nie powoduje żadnego szkodliwego ani genotoksycznego efektu w odniesieniu do liczby aplikacji substancji lub drogi podawania, należy wykonać badania wstępne przed przystąpieniem do pełnego badania w celu ustalenia dopuszczalności stosowania kontroli z nośnikiem.

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

Chociaż istnieje mało danych na temat samic, na podstawie których można dokonać porównania między płciami w odniesieniu do testu kometowego, na ogół reakcje genotoksyczne *in vivo* są podobne u samców i u samic, w związku z czym większość badań można prowadzić na zwierzętach dowolnej płci. Dane wskazujące na występowanie istotnych różnic między samcami i samicami (np. różnice w toksyczności ogólnoustrojowej, metabolizmie, biodostępności itd., w tym np. w badaniu ustalającym zakres dawkowania) stanowią przesłankę przemawiającą za przeprowadzaniem badań na zwierzętach obu płci. W takim przypadku właściwe może być przeprowadzenie badania na zwierzętach obu płci, np. w ramach badania toksyczności dawki powtórzonej. Zastosowanie planu czynnikowego może być właściwe, jeżeli do badania używa się zwierząt obu płci. Szczegółowe informacje dotyczące sposobu analizy danych z wykorzystaniem tego planu można znaleźć w dodatku 2.

Na początku badania (i w toku ustalania biegłości) należy ustalić liczebność grup w celu zapewnienia w każdej grupie co najmniej 5 nadających się do poddania analizie zwierząt jednej płci lub każdej płci, jeżeli wykorzystuje się zwierzęta obu płci (mniej w grupie jednoczesnej kontroli dodatnie – zob. pkt 29). Jeżeli narażenie człowieka na działanie substancji chemicznych może mieć charakter uzależniony od płci, jak to na przykład ma miejsce w przypadku niektórych produktów leczniczych, badanie należy przeprowadzić na zwierzętach odpowiedniej płci. Wskazówka odnośnie do maksymalnych typowych wymagań w zakresie liczby zwierząt – w przypadku prowadzonego zgodnie z parametrami ustalonymi w pkt 33 z trzema grupami otrzymującymi dawki i jednoczesną kontrolą ujemną i dodatnią (każda grupa złożona z pięciu zwierząt jednej płci) wymagane byłoby użycie 25–35 zwierząt.

HARMONOGRAM PODAWANIA SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

Zwierzętom należy codziennie podawać badaną substancję chemiczną przez co najmniej 2 dni (tj. dwa lub więcej podań w odstępach około 24 godzin) i należy pobrać próbki raz po 2–6 godzinach (lub po T_{maks}) od ostatniego podania substancji (12). Dopuszczalne są próbki uzyskane w wyniku przedłożonych schematów dawkowania (np. dawka podawana codziennie przez 28 dni). Wykazano dobre wyniki połączenia testu kometowego z testem mikrojądrowym na erytrocytach (10) (19). Należy jednak starannie rozważyć kwestie logistyczne związane z pobieraniem próbek tkanki do celów testu kometowego i jednoczesnym spełnieniem wymagań w zakresie pobierania próbek tkanki do celów innych rodzajów ocen toksykologicznych. Pobranie próbek po upływie 24 godzin od podania ostatniej dawki, co jest typowe dla ogólnego badania toksyczności, nie jest właściwe w większości przypadków (zob. pkt 40 dotyczący okresu pobierania próbek). Zastosowanie innych schematów podawania substancji i pobierania próbek należy uzasadnić (zob. dodatek 3). Można na przykład zastosować pojedyncze dawki substancji i wielokrotne pobranie próbek, należy jednak zauważyć, że do badania polegającego na jednorazowym podaniu substancji wymagana będzie większa liczba zwierząt ze względu na potrzebę wielokrotnego pobierania próbek, chociaż czasami rozwiązanie to może być preferowane, np. jeżeli badana substancja chemiczna powoduje podwyższoną toksyczność w wyniku powtarzanego podawania.

▼M7

Niezależnie od tego, jaki jest sposób wykonywania badania, jest on dopuszczalny, o ile badana substancja chemiczna pozwala uzyskać reakcję dodatnią lub, w przypadku badania ujemnego, o ile dostarczył on bezpośredniego lub pośredniego dowodu potwierdzającego narażenie tkanki docelowej lub toksyczność dla tkanki docelowej bądź została osiągnięta dawka graniczna (zob. pkt 36).

Badane substancje chemiczne mogą być również podawane jako dawka dzielona, tj. dwa podania tego samego dnia w odstępie czasu nie większym niż 2–3 godziny, aby łatwiej było podawać substancję w dużej objętości. W takich okolicznościach okres pobierania próbek powinien zostać zaplanowany w oparciu o czas podania ostatniej dawki (zob. pkt 40).

Poziomy dawek

W przypadku przeprowadzenia wstępnego badania ustalającego zakres dawkowania ze względu na brak dostępnych odpowiednich danych z innych odpowiednich badań umożliwiających dobranie dawki, badanie takie należy wykonać w tym samym laboratorium z wykorzystaniem tego samego gatunku, szczepu, płci i schematu podawania substancji chemicznej, jakie mają być stosowane w głównym badaniu zgodnie z obecnie stosowanymi podejściami do wykonywania badań ustalających zakres dawkowania. Celem badania powinno być określenie maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) zdefiniowanej jako dawka powodująca niewielkie efekty toksyczne w stosunku do czasu trwania badania (na przykład wyraźne kliniczne objawy, takie jak nietypowe zachowanie lub reakcje, niewielki spadek masy ciała lub cytotoksyczność tkanek docelowych), ale niepowodująca śmierci lub objawów bólu, cierpienia albo stresu, które wiązałyby się z koniecznością uśmiercenia zwierzęcia. W przypadku badanej substancji chemicznej niemającej właściwości toksycznych z okresem podawania wynoszącym co najmniej 14 dni, maksymalna (graniczna) dawka wynosi 1 000 mg/kg masy ciała na dobę. W przypadku okresów podawania poniżej 14 dni maksymalna (graniczna) dawka wynosi 2 000 mg/kg masy ciała na dobę. Wspomniane wartości graniczne mogą różnić się w przypadku niektórych rodzajów badanych substancji chemicznych (np. produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi), które są objęte przepisami szczególnymi.

Substancje chemiczne wykazujące intensywne parametry toksykokinetyczne lub wywołujące procesy detoksykacji, które mogą prowadzić do zmniejszenia narażenia po długim okresie podawania substancji chemicznej, mogą stanowić wyjątki w odniesieniu do kryteriów ustalania dawki i powinny być oceniane na zasadzie jednostkowych przypadków.

W przypadku testu kometowego zarówno ostrej, jak i podostrej toksyczności poza maksymalną dawką (MTD, maksymalną osiągalną dawka, maksymalnym narażeniem lub dawką graniczną) dla każdego okresu pobierania próbek należy dobrać malejącą sekwencję co najmniej dwóch dodatkowych poziomów dawek, między którymi jest odpowiedni odstęp (najlepiej różniących się o mniej niż 10) w celu wykazania zależności dawka-odpowiedź. Najlepiej byłoby, gdyby zastosowane poziomy dawek obejmowały również zakres od dawki maksymalnej do dawki wywołującej toksyczność w niewielkim stopniu lub dawki niewywołującej toksyczności. W przypadku zaobserwowania toksyczności w tkance docelowej przy wszystkich badanych poziomach dawek zaleca się dalsze badania z wykorzystaniem dawek nietoksycznych (zob. pkt 54–55). W przypadku badań przeprowadzanych w celu bardziej szczegółowego zbadania przebiegu krzywej dawka-efekt konieczne może okazać się utworzenie dodatkowych grup otrzymujących dawki.

Podawanie dawek

Planując badanie, należy wziąć pod uwagę przewidywaną drogę narażenia ludzi. W związku z tym można wybrać jako uzasadnione takie drogi podawania jak: z paszą, z wodą do picia, miejscowe, podskórne, dożylne, ustne (przez sondę), przez wdychanie, dotchawicze lub przez implantację. W każdym razie drogę narażenia należy dobrać w taki sposób, aby zapewnić odpowiednie narażenie tkanek docelowych. Nie zaleca się na ogół dokonywania wstrzyknięć dootrzewnowych, ponieważ nie jest to typowa istotna droga narażenia ludzi, i należy je

▼M7

stosować wyłącznie ze szczegółowym uzasadnieniem (np. niektóre substancje służące do kontroli dodatniej, do celów badawczych lub w przypadku niektórych produktów leczniczych podawanych dootrzewnowo). Maksymalna objętość płynu, jaką można podać przez sondę lub wstrzyknąć jednorazowo, zależy od wielkości zwierzęcia doświadczalnego. Objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można zastosować 2 ml/100 g masy ciała. Wykorzystanie objętości wyższych niż podane (jeżeli są dopuszczone przepisami dotyczącymi dobrostanu zwierząt) musi być uzasadnione. W miarę możliwości różne poziomu dawek należy uzyskać, dostosowując stężenie dawkowanej postaci użytkowej substancji w celu zapewnienia stałej objętości w stosunku do masy ciała przy wszystkich poziomach dawek.

Okres pobierania próbek

Okres pobierania próbek jest kluczową zmienną, ponieważ jest uwarunkowany czasem potrzebnym do osiągnięcia maksymalnego stężenia przez badane substancje chemiczne w tkance docelowej i doprowadzenia do pęknięcia łańcuchów DNA, ale zanim te pęknięte fragmenty zostaną usunięte, naprawione lub doprowadzą do śmierci komórki. Trwałość niektórych zmian patologicznych prowadzących do pęknięć łańcuchów DNA wykrytych w teście kometowym może być bardzo krótka, przynajmniej w przypadku niektórych substancji chemicznych badanych *in vitro* (52) (53). Jeżeli zatem zachodzi podejrzenie wystąpienia takich przejściowych zmian DNA, należy zastosować środki mające na celu ograniczenie strat uszkodzonego DNA poprzez zapewnienie dostatecznie wczesnego pobrania próbek tkanek, nawet wcześniejszego niż podane poniżej standardowe wartości czasu. Optymalny okres pobierania próbek może być zależny od substancji chemicznej lub drogi jej podawania skutkującej na przykład szybkim narażeniem tkanek w wyniku podawania dożylnego lub narażenia inhalacyjnego. Dlatego też należy, w miarę możliwości, określić okres pobierania próbek na podstawie danych kinetycznych (np. czasu (T_{maks}), w którym zostaje osiągnięte szczytowe stężenie (C_{maks}) w osoczu lub tkance lub stan równowagi w przypadku wielokrotnego podania). W przypadku braku danych kinetycznych kompromisowe rozwiązanie kwestii pomiaru genotoksyczności polega na pobraniu próbek po upływie 2–6 godzin od ostatniego podania substancji w przypadku dwóch lub większej liczby podań albo po upływie zarówno 2–6, jak i 16–26 godzin po jednokrotnym podaniu, należy jednak zadbać, aby sekcja wszystkich zwierząt nastąpiła w tym samym czasie po ostatnim (lub jedynym) podaniu dawki. Informacje na temat wystąpienia efektów toksycznych w organach docelowych (o ile są dostępne) można również wykorzystać do ustalenia odpowiedniego okresu pobierania próbek.

Obserwacje

Ogólne obserwacje kliniczne pod kątem stanu zdrowia zwierząt powinny być przeprowadzane i rejestrowane co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze z uwzględnieniem szczytowego okresu przewidywanych skutków po dawkowaniu (54). Co najmniej dwa razy dziennie wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane pod kątem zachorowalności i upadkowości. W przypadku badań trwających przez dłuższy czas wszystkie zwierzęta powinny być ważone co najmniej raz w tygodniu oraz po zakończeniu okresu badania. Przy każdej zmianie pokarmu i co najmniej raz w tygodniu należy zmierzyć spożycie pokarmu. Jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie do picia, należy mierzyć spożycie wody przy każdej zmianie wody i co najmniej raz w tygodniu. Zwierzęta, u których stwierdzono oznaki podwyższonej toksyczności nieprowadzące do śmierci, należy uśmiercić przed zakończeniem okresu badania i zasadniczo nie wykorzystuje się ich do testu kometowego.

Pobieranie tkanek

Ponieważ możliwe jest zbadanie indukowania pęknięć łańcucha DNA (komet) na praktycznie dowolnej tkance, uzasadnienie wyboru tkanek, które mają zostać pobrane, powinno być jasne i oparte na przyczynie przeprowadzenia badania oraz na wszelkich istniejących danych dotyczących wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania, genotoksyczności, rakotwórczości lub innych danych dotyczących toksyczności w odniesieniu do badanych substancji chemicznych. Do istotnych czynników, które należy rozważyć, należą: droga podawania (w oparciu o prawdopodobną drogę lub prawdopodobne drogi narażenia ludzi), przewidywana dystrybucja i wchłanianie w tkankach, rola metabolizmu oraz możliwy mechanizm działania badanych substancji chemicznych. Najczęściej

▼M7

badaną tkanką, w odniesieniu do której istnieje najwięcej danych, jest tkanka wątroby. W związku z tym w przypadku braku informacji ogólnych oraz jeżeli nie określono konkretnych tkanek będących przedmiotem zainteresowania, pobranie próbek wątroby będzie uzasadnione, ponieważ jest to podstawowy organ, w którym zachodzi metabolizm ksenobiotyczny i który jest często bardzo narażony zarówno na działanie substancji macierzystych, jak i metabolitów. W niektórych przypadkach najodpowiedniejsze może być badanie miejsca bezpośredniego kontaktu (na przykład części gruczołowej żołądka lub dwunastnicy/jelita czczego w przypadku doustnie podawanych substancji chemicznych lub płuc w przypadku substancji chemicznych podawanych drogą inhalacji). Dodatkowe lub alternatywne tkanki należy wybierać w oparciu o określone powody wykonywania badania, ale może okazać się przydatne zbadanie wielu tkanek u tych samych zwierząt, pod warunkiem że laboratorium wykazało biegłość w badaniu tych tkanek i kompetencje w jednoczesnym badaniu wielu tkanek.

Przygotowanie próbek

W odniesieniu do procesów opisanych w poniższych punktach (44–49) ważne jest, aby wszystkie roztwory lub stabilne zawiesiny były stosowane przed upływem terminu ich ważności lub w razie potrzeby świeżo przygotowywane. Również w kolejnych punktach poruszona została kwestia czasu poświęconego na (i) pobranie każdej tkanki po wykonaniu sekcji, (ii) przetworzenie każdej tkanki na zawiesinę komórek/jader oraz (iii) przetworzenie zawiesiny i przygotowanie szkiełek mikroskopowych z preparatami, przy czym są to wszystko kluczowe zmienne (zob. definicje, dodatek 1) i w związku z tym na etapie ustalania metody i wykazywania biegłości należy określić dopuszczalny czas, który należy przeznaczyć na wykonanie każdej z tych czynności.

Po upływie odpowiedniego czasu od ostatniego podania badanej substancji chemicznej zwierzęta zostają uśmiercone zgodnie z obowiązującymi przepisami dotyczącymi dobrostanu zwierząt i zasadą 3R. Usuwa się i wyizolowuje wybrane tkanki, których pewna część zostaje pobrana do testu kometowego, a jednocześnie należy pobrać wycinek tej samej tkanki i umieścić w roztworze formaldehydu lub odpowiednim roztworze utrwalającym w celu ewentualnego wykonania analizy histopatologicznej (zob. pkt 55) zgodnie ze standardowymi metodami (12). Tkankę przeznaczoną do wykonania testu kometowego umieszcza się w roztworze buforowym do rozdrabniania w celu usunięcia pozostałości krwi i przechowuje w silnie schłodzonym roztworze buforowym do rozdrabniania do czasu jej przetworzenia. Można również wykonać perfuzję *in situ*, np. w przypadku wątroby lub nerek.

Istnieje wiele opublikowanych metod izolowania komórek/jąder. Do tych metod należy rozdrabnianie tkanek, takich jak wątroba i nerki, zeskrobywanie powierzchni śluzówki w przypadku przewodu pokarmowego, homogenizacja i rozkład enzymatyczny. W ramach próby walidacyjnej JaCVAM badano jedynie wyizolowane komórki i w związku z tym pod względem ustalania metody i możliwości odniesienia się do danych z próby JaCVAM w celu wykazania biegłości preferowane są wyizolowane komórki. Wykazano jednak, że nie ma zasadniczej różnicy między wynikami testu bez względu na to, czy używa się komórek czy jąder (8). Również inne metody izolowania komórek/ jąder (np. homogenizacja, rozdrabnianie, rozkład enzymatyczny i filtracja na filtrze siatkowym) dają porównywalne wyniki (55). W świetle powyższego można stosować wyizolowane komórki albo wyizolowane jądra. Laboratorium powinno dokładnie ocenić i poddać walidacji metody izolowania pojedynczych komórek/jąder stosownie do określonej tkanki. Jak omówiono w pkt 40, trwałość niektórych zmian patologicznych prowadzących do pęknięć łańcuchów DNA wykrytych w teście kometowym może być bardzo krótka (52) (53). W związku z tym, bez względu na zastosowaną metodę przygotowania zawiesiny pojedynczej komórki/jadra, istotne jest, aby tkanki zostały przetworzone bezzwłocznie po uśmierceniu zwierząt i umieszczone w warunkach, w których zanikanie zmian patologicznych jest ograniczone (np. dzięki przechowywaniu tkanek w niskiej temperaturze). Zawiesiny komórek należy przechowywać w stanie silnie schłodzonym do momentu ich użycia, aby zapewnić jak najmniejsze zmiany temperatur wewnątrz próbki i możliwość wykazania odpowiednich reakcji w kontroli dodatniej i ujemnej.

▼M7

PRZYGOTOWANIE PREPARATÓW

Preparaty należy przygotować jak najszybciej (najlepiej w ciągu godziny) po przygotowaniu pojedynczej komórki/jądra, przy czym należy ściśle kontrolować i poddać walidacji w warunkach laboratoryjnych temperaturę i czas między uśmierceniem zwierzęcia a przygotowaniem preparatów. Objętość zawiesiny komórek dodana do agarozy o niskiej temperaturze topnienia (zazwyczaj 0,5–1,0 %) w celu sporządzenia preparatów nie powinna obniżać procentowej objętości agarozy o niskiej temperaturze topnienia do mniej niż 0,45 %. Optymalne zagęszczenie komórek zostanie oznaczone za pomocą systemu analizy obrazu wykorzystywanego do zliczania komet.

Liza

Warunki lizy są również kluczową zmienną i mogą prowadzić do zakłócenia procesu pękania łańcuch DNA na skutek określonych rodzajów modyfikacji DNA (niektóre alkilacje i zasadowe addukty DNA). W związku z tym zaleca się utrzymanie warunków lizy na maksymalnie stałym poziomie w odniesieniu do wszystkich preparatów w ramach doświadczenia. Po przygotowaniu preparatów należy je zanurzyć w schłodzonym roztworze lizującym na co najmniej godzinę (lub na całą noc) w temperaturze 2–8 °C w stonowanym oświetleniu, np. w żółtym świetle (lub zasłonięte przed dostępem światła), które pozwala uniknąć narażenia na dostęp światła białego, które może zawierać składowe UV. Po tym okresie inkubacji, przed przystąpieniem do etapu rozwijania łańcucha DNA w środowisku zasadowym, należy opłukać szkiełka mikroskopowe w celu usunięcia pozostałości detergentu i soli. Do płukania można użyć oczyszczonej wody, zobojętniającego roztworu buforowego lub buforu fosforanowego. Można również zastosować roztwór buforowy używany do elektroforezy. Pozwoli to zachować warunki środowiska zasadowego w komorze do elektroforezy.

Rozwijanie łańcucha DNA i elektroforeza

Należy losowo rozmieścić szkiełka mikroskopowe na platformie aparatu do elektroforezy typu zanurzeniowego zawierającego dostateczna ilość roztworu do elektroforezy, tak aby powierzchnie szkiełek mikroskopowych zostały całkowicie przykryte (głębokość warstwy roztworu na szkiełkiem powinna być również spójna w kolejnych seriach badań). W innego rodzaju aparatach do elektroforezy stosowanych w teście kometowym, tj. wyposażonych w układy aktywnego chłodzenia, obiegu i zasilanie o dużej mocy, grubsza warstwa roztworu na szkiełkami spowoduje przepływ prądu o wyższym natężeniu przy stałym napięciu. Należy rozmieścić szkiełka mikroskopowe w zbiorniku do elektroforezy w sposób zrównoważony, aby osłabić wpływ różnych tendencji lub efektów styku ze zbiornikiem i ograniczyć do minimum zmienność między partiami, tj. w każdej serii badania metodą elektroforezy powinna występować ta sama liczba szkiełek mikroskopowych z preparatami z każdego zwierzęcia objętego badaniem oraz powinny być uwzględnione próbki z różnych grup dawkowania, a także z kontroli ujemnej i dodatniej. Należy pozostawić szkiełka na co najmniej 20 minut, aby łańcuchy DNA rozwinęły się, a następnie poddać je elektroforezie w kontrolowanych warunkach, co zwiększy czułość i zakres oznaczania testu (tj. doprowadzi do dopuszczalnych poziomów procentowej zawartości DNA w ogonie w kontroli ujemnej i dodatniej, które zwiększają czułość). Poziom migracji DNA jest liniowo powiązany z czasem trwania elektroforezy, a także z potencjałem elektrycznym (V/cm). Na podstawie próby JaCVAM może on wynosić 0,7 V/cm przez co najmniej 20 minut. Czas trwania elektroforezy uważa się za kluczową zmienną i należy ustalić czas elektroforezy w celu optymalizacji zakresu oznaczania. Wydłużenie czasu elektroforezy (np. do 30 lub 40 minut w celu zmaksymalizowania czułości) prowadzi zazwyczaj do silniejszych reakcji dodatnich ze znanymi mutagenami. Wydłużenie czasu elektroforezy może jednak również prowadzić do nadmiernej migracji w próbkach kontrolnych. W trakcie każdego doświadczenia napięcie musi być utrzymywane na stałym poziomie, a zmienność pozostałych parametrów powinna mieścić się w wąskim i określonym zakresie, na przykład w próbie JaCVAM potencjał 0,7 V/cm był wytwarzany przy początkowym natężeniu prądu 300 mA. Głębokość roztworu buforowego powinna być

▼M7

skorygowana, aby można było uzyskać wymagane warunki i utrzymać je przez cały czas trwania doświadczenia. Należy zarejestrować wartości natężenia prądu na początku i na końcu procesu elektroforezy. W związku z tym na wstępnym etapie wykazywania biegłości w danym laboratorium należy określić optymalne warunki w odniesieniu do każdej badanej tkanki. Temperaturę roztworu użytego do elektroforezy należy utrzymywać na etapie rozwijania łańcucha DNA i procesu elektroforezy na niskim poziomie – zazwyczaj 2–10 °C (10). Należy zarejestrować temperaturę roztworu użytego do elektroforezy na początku rozwijania się łańcucha DNA, na początku elektroforezy i po zakończeniu elektroforezy.

Po zakończeniu elektroforezy szkiełka mikroskopowe należy na co najmniej 5 minut zanurzyć lub przez taki czas płukać w zobojętniającym roztworze buforowym. Żele można barwić i zliczać w stanie „świeżym" (np. w ciągu 1–2 dni) lub można odwodnić do celów późniejszego zliczania (np. w ciągu 1–2 tygodni po barwieniu) (56). Należy jednak dokonać walidacji warunków w trakcie wykazywania biegłości oraz uzyskać dane historyczne, które należy zachować oddzielnie w odniesieniu do każdego z tych warunków. W tym ostatnim przypadku szkiełka mikroskopowe należy odwodnić przez zanurzenie w czystym etanolu na co najmniej 5 minut, pozostawić do wyschnięcia na powietrzu, a następnie przechowywać w temperaturze pokojowej lub w pojemniku w lodówce do momentu zliczania.

Metody pomiaru

Komety należy oceniać ilościowo, wykorzystując do tego celu automatyczny lub półautomatyczny system analizy obrazu. Szkiełka mikroskopowe będą barwione za pomocą odpowiedniego barwnika fluorescencyjnego, np. SYBR Gold, Green I, jodku propidyny lub bromku etydyny, i mierzone przy odpowiednim powiększeniu (np. 200x) pod mikroskopem fluoroscencyjnym wyposażonym w odpowiednie czujniki lub kamerę cyfrową (np. CCD).

Komórki można zaklasyfikować do trzech kategorii zgodnie z opisami w atlasie obrazów komet (57), mianowicie komórki zliczalne, komórki niezliczalne oraz „komórki cieniowe" (dodatkowe wyjaśnienia można znaleźć w pkt 56). Aby uniknąć artefaktów, należy zliczyć tylko komórki zliczalne (z wyraźnie wykształconą głowa i ogonem, nieoddziałujące na sąsiednie komórki) pod kątem procentowej zawartości DNA w ogonie. Nie ma potrzeby zgłaszania częstości występowania komórek niezliczalnych. Częstość występowania „komórek cieniowych" należy określić wizualnie (ponieważ brak wyraźnego obrazu głowy będzie oznaczać, że nie jest łatwo je wykryć za pomocą analizy obrazu) przez zliczenie co najmniej 150 komórek na próbkę (dodatkowe wyjaśnienia można znaleźć w pkt 56) i udokumentować oddzielnie.

Wszystkie preparaty, w tym te służące do kontroli dodatniej i ujemnej, należy indywidualnie zakodować i zrandomizować, tak aby osoba zliczająca nie znała warunków podawania substancji chemicznej. W przypadku każdej próbki (na tkankę danego zwierzęcia) należy poddać analizie co najmniej 150 komórek (z wyłączeniem komórek cieniowych – zob. pkt 56). Zliczenie 150 komórek w odniesieniu do zwierzęcia u co najmniej 5 zwierząt na dawkę (mniej w próbie jednoczesnej kontroli dodatniej – zob. pkt 29) zapewnia dostateczną moc testu statystycznego, jak wynika z analizy w Smith *et al.*, 2008 (5). Jeżeli stosowane są szkiełka mikroskopowe, mogłoby to odpowiadać wynikom uzyskanym z 2 lub 3 szkiełek na próbkę w przypadku wykorzystania pięciu zwierząt na każdą grupę. Należy poddać obserwacji szereg obszarów szkiełka o zagęszczeniu gwarantującym, że nie występują nakładające się ogony. Należy unikać zliczania na krawędziach szkiełek mikroskopowych.

Pęknięcia łańcuchów DNA w teście kometowym można mierzyć, wykorzystując w tym celu niezależne punkty końcowe, takie jak procentowa zawartość DNA w ogonie, długość ogona i moment ogonowy. W przypadku użycia systemu analizy obrazu z odpowiednim oprogramowaniem można dokonać wszystkich trzech pomiarów. Zaleca się jednak, aby do oceny i interpretacji wyników stosować procentową zawartość DNA w ogonie (zwaną też procentową intensywnością ogona) (12) (40) (41) (42), którą wyznacza się przez intensywność fragmentu DNA w ognie wyrażoną jako procentowa część całkowitej intensywności komórki (13).

▼M7

Uszkodzenia tkanek i cytotoksyczność

Ustalenia potwierdzające toksyczność w teście kometowym mogą wynikać nie tylko z samej genotoksyczności – toksyczność tkanki docelowej może być również efektem nasilonej migracji DNA (12) (41). I odwrotnie – niska lub umiarkowana cytotoksyczność jest często powodowana przez znane genotoksyny (12), co wskazuje, że sam w sobie test kometowy nie pozwala odróżnić migracji DNA spowodowanej genotoksycznością od migracji spowodowanej cytototoksycznością. Jednak w przypadkach, w których obserwuje się wzrastającą migrację DNA, zaleca się zbadanie jednego wskaźnika cytotoksyczności lub większej ich liczby, ponieważ może to być pomocne w interpretacji wyników. Wzrastającą migrację DNA w obecności wyraźnego występowania cytotoksyczności należy interpretować z zachowaniem ostrożności.

Proponowano wiele miar cytotoksyczności i spośród nich zmiany histopatologiczne uznano za odpowiednią miarę toksyczności tkankowej. Obserwacje takie jak stan zapalny, nacieki komórkowe, zmiany apoptotyczne lub nekrotyczne były kojarzone ze wzrostem migracji DNA, jednak jak wykazano w próbie walidacyjnej JaCVAM (12) nie jest dostępna ostateczna lista zmian histopatologicznych zawsze kojarzonych ze zwiększoną migracją DNA. Zmiany w pomiarach dokonywanych w chemii klinicznej (np. AST, ALT) również mogą stanowić źródło przydatnych informacji na temat uszkodzeń tkanek i można również brać pod uwagę dodatkowe wskaźniki, takie jak aktywacja kaspaz, test TUNEL, test w obecności Aneksyny V itd. Istnieje jednak ograniczona liczba opublikowanych danych, które dotyczą wykorzystania tych ostatnich wskaźników w badaniach *in vivo*, a niektóre z nich mogą być mniej wiarygodne niż inne.

Komórki cieniowe (zwane również chmurami, ang. *hedgehog*) są to komórki, na których mikroskopowy obraz składa się mała lub nieistniejąca głowa oraz długie rozmyte ogony i które uważa się za bardzo poważnie uszkodzone komórki, chociaż ich etiologia nie jest dokładnie znana (zob. dodatek 3). Ze względu na ich wygląd pomiary procentowej zawartości DNA w ogonie za pomocą analizy obrazu są zawodne i w związku z tym komórki cieniowe powinny być oceniane oddzielnie. Należy odnotować i zgłosić obecność komórek cieniowych, zaś każdy wzrost ich liczby, który uznaje się za spowodowany badaną substancją chemiczną, należy zbadać i dokonać interpretacji wyników z zachowaniem ostrożności.Znajomość potencjalnego trybu działania badanych substancji chemicznych może być pomocna w takich rozważaniach.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

Zwierzę jest jednostką doświadczalną i w związku z tym zarówno dane dotyczące poszczególnych zwierząt, jak i podsumowanie wyników należy przedstawić w postaci tabeli. Ze względu na hierarchiczność danych zaleca się określenie mediany procentowej zawartości DNA w ogonie w odniesieniu do każdego szkiełka mikroskopowego i obliczenie średniej z wartości median w odniesieniu do każdego zwierzęcia (12). Następnie należy wyznaczyć średnią ze wszystkich średnich dla poszczególnych zwierząt w celu uzyskania średniej grupowej. Wszystkie te wartości należy uwzględnić w sprawozdaniu. Można zastosować alternatywne podejścia (zob. pkt 53), jeżeli jest to uzasadnione z naukowego i statystycznego punktu widzenia. Analizę statystyczną można wykonywać, stosując szereg podejść (58) (59) (60) (61). Jak przedstawiono w powyższych źródłach, dobierając metodę statystyczna, która zostanie zastosowana, należy zastanowić się nad potrzebą transformacji danych (np. w postać logarytmiczną lub pierwiastka kwadratowego) lub dodaniem małej liczby (np. 0,001) do wszystkich (nawet różnych od zera) wartości w celu ograniczenia wpływu zerowych wartości komórek. Szczegóły analizy interakcji pomiędzy podawaniem substancji chemicznej a płcią w przypadku wykorzystania w badaniu obu płci i późniejszej analizy danych w przypadku stwierdzenia różnic lub ich braku podano w dodatku 2. Należy także zgłosić dane dotyczą ce toksyczności i objawów klinicznych.

Kryteria dopuszczalności

Dopuszczalność testu ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

a. uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących jednoczesnej kontroli ujemnej do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej, jak opisano w pkt 16;

▼M7

b. jednoczesne kontrole dodatnie (zob. pkt 29) powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną;

c. poddano analizie wystarczające liczby komórek i dawek (pkt 52 i 36–38);

d. kryteria wyboru najwyższej dawki są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 36.

Ocena i interpretacja wyników

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli:

a. co najmniej jedna badana dawka wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,

b. ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany z dawką,

c. którykolwiek wynik znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej dla danego gatunku, nośnika, drogi podawania, tkanki i liczby podań.

W przypadku gdy wszystkie wspomniane kryteria są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna jest w stanie wywołać pęknięcia łańcucha DNA w tkankach badanych w danym układzie badawczym. Jeżeli spełnione jest tylko jedno lub tylko dwa spośród powyższych kryteriów, zob. pkt 62.

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli:

a. żadne z badanych stężeń nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,

b. ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany ze stężeniem.

c. wszystkie wyniki mieszczą się w obrębie rozkładu danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej w odniesieniu do danego gatunku, nośnika, drogi podawania, tkanki i liczby podań;

d. przedstawiono bezpośredni lub pośredni dowód potwierdzający narażenie tkanki docelowej bądź toksyczność dla tkanki docelowej.

Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za niezdolną do wywołania pęknięcia łańcucha DNA w tkankach badanych w danym układzie badawczym.

Weryfikacja wyraźnie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

Jeżeli reakcja nie jest ani wyraźnie ujemna, ani wyraźnie dodatnia (tj. nie wszystkie kryteria wymienione w pkt 59 lub 60 są spełnione) oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku, dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub wyniki dalszych przeprowadzonych badań, jeżeli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia. Przydatne może być zliczenie dodatkowych komórek (w stosownych przypadkach) lub powtórne przeprowadzenie doświadczenia, potencjalnie z zastosowaniem zoptymalizowanych warunków doświadczalnych (np. odstępów czasu między dawkami, innych dróg podawania, innych okresów pobierania próbek lub innych tkanek).

W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne i w takiej sytuacji zostanie uznany za niejednoznaczny.

▼M7

W celu dokonania oceny biologicznego znaczenia wyniku dodatniego lub niejednoznacznego muszą być dostępne informacje dotyczące cytotoksyczności w tkance docelowej (zob. pkt 54–55). W przypadku uzyskania dodatnich lub niejednoznacznych wyników wyłącznie w obecności oczywistszego dowodu na cytotoksyczność, badanie zostanie uznane za niejednoznaczne w odniesieniu do genotoksyczności, chyba że istnieje dostatecznie dużo pomocniczych informacji do celów sformułowania ostatecznego wniosku. W razie ujemnego wyniku badania w przypadku występowania objawów toksyczności przy wszystkich badanych dawkach zalecane byłoby dalsze badanie z wykorzystanie dawek nietoksycznych.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— źródło, numer partii (jeżeli dostępny);

— stabilność badanej substancji chemicznej, data graniczna do użytku lub data ponownej analizy, jeżeli są znane.

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem:

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika;

— rozpuszczalność oraz stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli są znane;

— przygotowanie postaci użytkowych dawek;

— oznaczenie analityczne postaci użytkowych (np. stabilność, jednorodność, stężenianominalne).

Zwierzęta doświadczalne:

— wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie ich wyboru,

— liczba, wiek i płeć zwierząt;

— źródło, warunki utrzymywania, pasza, urozmaicenie warunków bytowania itp.;

— masa ciała poszczególnych zwierząt na początku i na końcu badania, w tym zakres masy ciała, średnia i odchylenie standardowe dla każdej grupy.

Warunki badania:

— dane dotyczące kontroli dodatnich i ujemnych (z rozpuszczalnikiem/nośnikiem);

▼M7

— dane uzyskane w ramach badania ustalającego zakres dawkowania (jeżeli zostało przeprowadzone);

— uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania;

— szczegółowe informacje dotyczące przygotowania badanej substancji chemicznej;

— szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej;

— uzasadnienie drogi podawania;

— miejsce wstrzyknięcia (w odniesieniu do podawania droga podskórna lub dożylną);

— metody przygotowania próbek, o ile są dostępne, analizy histopatologiczne, w szczególności w przypadku substancji chemicznej dającej wynik dodatni w teście kometowym;

— uzasadnienie wyboru tkanek;

— metody sprawdzania, czy badana substancja chemiczna dotarła do tkanki docelowej lub do krwiobiegu w przypadku otrzymania wyników ujemnych;

— dawka faktyczna (mg/kg masy ciała na dobę) obliczona na podstawie stężenia badanej substancji chemicznej (ppm) w paszy/wodzie do picia (ppm) i spożycie, w stosownych przypadkach;

— szczegółowe informacje dotyczące jakości paszy i wody;

— szczegółowy opis harmonogramów podawania substancji chemicznej i pobierania próbek oraz ich uzasadnienie (np. dane toksykokinetyczne, o ile są dostępne);

— metoda uśmierzania bólu, analgezja;

— metoda uśmiercenia;

— procedury izolowania i konserwacji tkanek;

— metody przygotowywania zawiesiny pojedynczych komórek/jąder;

— źródło i numery partii wszystkich odczynników (o ile to możliwe);

— metody oceny cytotoksyczności;

— warunki elektroforezy;

— zastosowane techniki barwienia; oraz

— metody zliczania i pomiaru komet.

Wyniki:

— ogólne obserwacje kliniczne, o ile miały miejsce, przed badaniem i podczas całego okresu badania w odniesieniu do każdego zwierzęcia;

— dowody na wystąpienie cytotoksyczności, o ile była badana;

▼M7

— w przypadku badań trwających dłużej niż jeden tydzień: masa poszczególnych zwierząt w trakcie badania, w tym zakres masy ciała, średnia i odchylenie standardowe dla każdej grupy. spożycie pokarmu;

— zależność dawka-odpowiedź, jeżeli jest oczywista;

— w odniesieniu do każdej tkanki/zwierzęcia procentowa zawartość DNA w ogonie (lub inna miara, o ile została wybrana) i wartości mediany dla każdego szkiełka mikroskopowego, wartości średniej dla każdego zwierzęcia i wartości średniej dla każdej grupy;

— dane dotyczące jednoczesnych i historycznych kontroli ujemnych wraz z zakresami, średnimi i odchyleniami standardowymi w odniesieniu do każdej tkanki poddanej ocenie;

— dane dotyczące jednoczesnych oraz historycznych kontroli dodatnich;

— w przypadku tkanek innych niż wątroba wykres krzywej dawka-efekt na podstawie kontroli dodatniej. Można go sporządzić na podstawie danych zebranych podczas procedury wykazywania biegłości (zob. pkt 16–17) i dołączyć do niego uzasadnienie wraz z cytatami z aktualnych pozycji literatury przedmiotu w odniesieniu do poziomu i rozproszenia reakcji na substancje kontrolne w tej tkance;

— zastosowane analizy i metody statystyczne; oraz kryteria uznawania reakcji za dodatnią, ujemną lub niejednoznaczną,

— częstość występowania komórek cieniowych w każdej grupie i u poszczególnych zwierząt.

Omówienie wyników

Wniosek

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

(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*, t. 654/2, s. 114–132.

(2) Brendler-Schwaab, S. *et al.* (2005), The *in vivo* Comet assay:use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, t. 20/4, s. 245–254.

(3) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing:result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, t. 627/1, s. 31–35.

(4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, t. 817, s. 143–163.

(5) Smith, C.C. *et al.* (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, t. 23/3, s. 233–240.

(6) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, t. 18/1, s. 45–51.

(7) McKelvey-Martin, V.J.*et al.* (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay):a European review, *Mutation Research*, t. 288/1, s. 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*, t. 35/3, s. 206–221.

▼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*, t. 175/1, s. 184–191.

(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*, t. 702/1, s. 40–69.

(11) OECD (2015), Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015, publikacje OECD na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny, nr 234, OECD, Paryż.

(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*, seria dotycząca badań i oceny nry 195 i 196, OECD Publishing, Paryż.

(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*, t. 122/1, s. 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*, t. 13/1, s. 207–14.

(15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, t. 26/3, s. 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*, t. 723/2, s. 108–120.

(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*, t. 58/1, s. 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*, t. 25/2, s. 187–199.

(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*, t. 722/1, s. 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*, t. 35/2, s. 149–162.

(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*, t. 28/6, s. 621–623.

(22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, t. 19/1, s. 51–59.

(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*, t. 630/1, s. 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*, t. 393/1-2, s. 175–178.

▼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*, t. 726/2, s. 175–180.

(26) Struwe, M. *et al.* (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, t. 7/2, s. 240–249.

(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*, t. 742/1–2, s. 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*, t. 634/1–2, s. 51–59.

(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*, t. 627/1, s. 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*, t. 6/5, s. 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*, t. 30/6, s. 629–799.

(32) Sekihashi, K. *et al.* (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, t. 517/1–2, s. 53–74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity,** *Mutation Research*, t. 681/1, s. 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*, t. 71/3, s. 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*, t. 160/4, s. 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*, t. 33/2, s. 167–172.

(37) Pfuhler, S., H.U.Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 27/3, s. 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*, t. 817, s. 165–181.

(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*, t. 613, s. 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*, t. 605(1–2), s. 7–16.

(41) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, t. 627/1, s. 31–5.

(42) Kumaravel, T.S. *et al.* (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, t. 25/1, s. 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*, t. 26/6, s. 689–695.

(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*, t. 25/2, s. 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*, t. 25/2, s. 113–123.

(46) Azqueta, A. *et al.* (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, t. 724/1–2, s. 41–45.

(47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, t. 723/2, s. 87–90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, Nowy Jork, wyd. II.

(49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)

(50) Rozdział B.8 niniejszego załącznika: *Subacute Inhalation Toxicity:28-Day Study*.

(51) Rozdział B.29 niniejszego załącznika*: Subchronic Inhalation Toxicity:90-day Study*.

(52) Blakey, D.H., G.R.Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, t. 140/2–3, s. 141–145.

(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*, t. 140/2–3, s. 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", Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 19, OECD Publishing, Paryż.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, t. 34/1, s. 50–54.

(56) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, t. 18/1, s. 45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokio, Japonia.

(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*, t. 19/2, s. 109–119.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, t. 18/2, s. 167–75.

(60) Bright, J. *et al.* (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, t. 10/6, s. 485–493.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, t. 23/3, s. 171–182.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICJE

Elektroforeza żelowa pojedynczych komórek w środowisku alkalicznym: Czuła technika wykrywania uszkodzenia podstawowego DNA na poziomie poszczególnych komórek/jąder.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Kometa: kształt przybierany przez nukleoidy pod wpływem pola elektroforetycznego z powodu podobieństwa do komet: głową komety jest jądro komórki, a ogon zostaje utworzony przez DNA migrujące z jądra w polu elektrycznym.

Kluczowa zmienna / kluczowy parametr: jest to zmienna protokołu, która na skutek niewielkiej zmiany może mieć bardzo duży wpływ na wnioski wynikające z testu. Kluczowe zmienne mogą być charakterystyczne dla danej tkanki. Nie należy modyfikować kluczowych zmiennych, w szczególności w trakcie testu, bez uprzedniego rozważenia, w jaki sposób modyfikacja może wpłynąć na zamianę wyniku testu, na przykład na podstawie wielkości i zmienności reakcji w kontroli dodatniej i ujemnej. Sprawozdanie z badania powinno zawierać listę modyfikacji kluczowych zmiennych wprowadzonych w trakcie testu lub w porównaniu ze standardowym protokołem danego laboratorium, wraz z podaniem uzasadnienia każdej modyfikacji.

Intensywność ogona lub procentowa zawartość DNA w ogonie: jest to odpowiednik intensywności ogona komety w stosunku do całkowitej intensywności (głowa + ogon). Odzwierciedla ilość pęknięć DNA wyrażoną w procentach.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

▼M7

Dodatek 2

PLAN CZYNNIKOWY MAJĄCY NA CELU USTALENIE RÓŻNIC PŁCIOWYCH W TEŚCIE KOMETOWYM *IN VIVO*

Plan czynnikowy i jego analiza

W ramach takiego planu poddaje się badaniu co najmniej 5 samców i 5 samic przy każdym poziomie stężenia, co oznacza wykorzystanie co najmniej 40 zwierząt (20 samców i 20 samic oraz odpowiednie kontrole dodatnie).

Plan ten, będący jednym z prostszych planów czynnikowych, jest równoważny dwukierunkowej analizie wariancji, w której płeć i poziom stężenia stanowią efekty główne. Dane te można analizować, stosując wiele standardowych pakietów oprogramowania statystycznego, takich jak SPSS, SAS, STATA i Genstat, a także wykorzystując R.

W ramach analizy dokonuje się podziału zmienności w zbiorze danych na zmienność pomiędzy płciami, zmienność pomiędzy stężeniami oraz na zmienność zależną od interakcji pomiędzy płciami i stężeniami. Każdy z członów porównuje się z szacunkową zmiennością pomiędzy zwierzętami z kontrpróby w ramach grup zwierząt tej samej płci, którym podaje się substancję chemiczną w takim samym stężeniu. Szczegółowe informacje na temat metodyki przeprowadzania tego doświadczenia można znaleźć w wielu standardowych podręcznikach statystycznych (zob. bibliografia) oraz w narzędziach pomocowych dostarczanych razem z pakietami oprogramowania statystycznego.

Analizę rozpoczyna się od sprawdzenia członu interakcji płci ze stężeniem w tabeli ANOVA ([1]). W przypadku braku członu istotnej interakcji połączone wartości dla poszczególnych płci lub dla poszczególnych poziomów stężeń mogą posłużyć jako ważne testy statystyczne pomiędzy poziomami na podstawie członu zmienności wewnątrzgrupowej w tabeli ANOVA.

Kolejnym etapem analizy jest podział szacunku zmienności pomiędzy stężeniami na kontrasty do celów przeprowadzenia testu reakcji pod kątem kontrastów liniowych i kwadratowych przy poszczególnych poziomach stężeń. W przypadku wystąpienia istotnej interakcji pomiędzy płcią a stężeniem człon ten można również podzielić na kontrasty interakcji pomiędzy efektem liniowym a płcią oraz pomiędzy efektem kwadratowym a płcią. Człony te umożliwiają zbadanie, czy zależność stężenie-odpowiedź przebiega równolegle dla obydwu płci, czy też otrzymuje się różne odpowiedzi dla obu płci.

Szacunek zmienności wewnątrzgrupowej można wykorzystać do przeprowadzenia testów parami w odniesieniu do różnicy między średnimi. Tego rodzaju porównania można przeprowadzać pomiędzy średnimi dla obydwu płci oraz pomiędzy średnimi dla poszczególnych poziomów stężeń, np. w celu porównania z poziomami odnotowanymi w kontrolach ujemnych. W przypadkach, w których występuje istotna interakcja, można dokonać porównań pomiędzy średnimi dla poszczególnych stężeń w ramach danej płci lub pomiędzy średnimi dla poszczególnych płci w ramach danego stężenia.

Bibliografia

Istnieje wiele podręczników statystycznych poświęconych teorii, planowaniu, metodyce, analizie i interpretacji planów czynnikowych – począwszy od najprostszych analiz dwuczynnikowych po bardziej złożone formy wykorzystywane w metodyce planowania doświadczeń. Poniższa lista nie jest wyczerpująca. Niektóre publikacje zawierają praktyczne przykłady porównywalnych planów, niekiedy razem z kodem niezbędnym do przeprowadzenia analiz przy wykorzystaniu różnych pakietów oprogramowania.

([1]) Statystycy stosujący podejście modelowe, np. ogólne modele liniowe, mogą przeprowadzić analizę w inny, choć porównywalny, sposób, ale niekoniecznie muszą wyprowadzać tradycyjną tabelę ANOVA, która wywodzi się z algorytmicznych podejść do obliczania danych statystycznych opracowanych przed pojawieniem się komputerów.

▼M7

(1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. i Hunter, J.S.(1978).Statistics for Experimenters.An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building.Nowy Jork:John Wiley & Sons.

(2) Box G.E.P. i Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

(3) Doncaster, C.P.i 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 i Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

Dodatek 3

OBECNE OGRANICZENIA TESTU

Ze względu na bieżący stan wiedzy występuje szereg ograniczeń związanych z testem kometowym *in vivo*. Należy oczekiwać, że ograniczenia te zostaną częściowo wyeliminowane lub zdefiniowane w węższym zakresie, ponieważ zdobyto większe doświadczenie w zakresie stosowania testu do celów rozwiązywania problemów w kontekście regulacyjnym.

1. Niektóre rodzaje uszkodzeń DNA mogą być krótkotrwałe, tj. zostać naprawione zbyt szybko, aby można było je zaobserwować w ciągu 24 godzin lub po upływie dłuższego okresu od ostatniej dawki. Nie istnieje żadna znana lista tych rodzajów krótkotrwałych uszkodzeń ani substancji chemicznych, które mogą powodować tego rodzaju uszkodzenia, ani też nie wiadomo, na przestrzeni jakiego okresu można takie uszkodzenia wykryć. Optymalne okresy pobierania próbek mogą również zależeć od substancji chemicznej lub drogi podawania, należy zatem określić okresy pobierania próbek na podstawie danych kinetycznych (np. czasu, T_{maks}, w którym zostaje osiągnięte szczytowe stężenie (Cmaks) w osoczu lub tkance), ilekroć tego rodzaju dane są dostępne. W przypadku większości badań walidacyjnych wykonywanych jako wsparcie niniejszej metody badawczej określano czas sekcji na 2 lub 3 godziny po podaniu ostatniej dawki. W przypadku większości badań w publikowanej literaturze jest mowa o podawaniu ostatniej dawki na 2–6 godzin przez uśmierceniem. W związku z tym doświadczenia te były wykorzystywane jako podstawa zalecenia dotyczącego przedmiotowej metody badawczej, zgodnie z którym w razie braku innych danych, ostatnią dawkę należy podać w ściśle określonym momencie na 2–6 godzin przed sekcją.

2. W przeciwieństwie do podawania przez sondę nie istnieją znane dane badawcze, które określają czułość testu na wykrycie krótkotrwałego uszkodzenia DNA po podaniu substancji w paszy lub wodzie do picia. Uszkodzenia DNA wykrywano po podaniu substancji w karmie i wodzie do picia, ale istnieje stosunkowo mało takich zgłoszeń w porównaniu ze znacznie większym doświadczeniem w tym względzie z podawaniem przez sondę i podaniem dootrzewnowym. Zatem czułość testu może być mniejsza w przypadku substancji chemicznych, które wywołują krótkotrwałe uszkodzenia, podawanych w karmie lub wodzie do picia.

3. Nie prowadzono żadnych międzylaboratoryjnych badań na tkankach innych niż tkanki wątroby i żołądka, w związku z tym nie sformułowano żadnego zalecenia w odniesieniu do sposobu, w jaki należy uzyskać czułą i odtwarzalną reakcję w tkankach innych niż wątroba, takich jak przewidywane zakresy kontroli dodatniej i ujemnej. W przypadku wątroby nie można było również osiągnąć porozumienia w sprawie ustalenia dolnej wartości granicznej kontroli ujemnej.

4. Chociaż istnieje szereg publikacji potwierdzających mylący efekt badania cytotoksyczności *in vitro*, opublikowano bardzo mało danych na temat badań *in vivo* i w związku z tym nie można zalecić żadnej pojedynczej miary cytotoksyczności. Zjawiska histopatologiczne takie jak stan zapalny, nacieki komórkowe, zmiany apoptotyczne lub nekrotyczne były kojarzone ze wzrostem migracji DNA, jednak jak wykazano w próbie walidacyjnej JaCVAM (OECD, 2014) zmiany te nie zawsze prowadzą do wykrycia komet i w związku z tym nie jest dostępna ostateczna lista zmian histopatologicznych zawsze kojarzonych ze zwiększoną migracją DNA. W przeszłości sugerowano, że obecność komórek cieniowych (lub chmur) jest wskaźnikiem cytotoksyczności, jednak etiologia tych komórek nie jest dokładnie znana. Istnieją dane, z których wynika, że ich powstawanie może być spowodowane cytotoksycznością związaną z substancją chemiczną, uszkodzeniem mechanicznym / spowodowanym przez działanie enzymów, które zostało zainicjowane podczas przygotowywania próbki (Guerard *et al.*, 2014), lub bardziej ekstremalnym skutkiem genotoksyczności substancji chemicznej. Inne dane wydają się wskazywać, że zostały uzyskane w wyniku rozległych, ale być może dających się naprawić, uszkodzeń DNA (Lorenzo *et al.*, 2013).

▼M7

5. Tkanki lub jądra komórkowe były z powodzeniem zamrażane na potrzeby późniejszej analizy. Zazwyczaj powoduje to wymierny wpływ na reakcję na kontrolę z nośnikiem i kontrolę dodatnią (Recio *et al.*, 2010;Recio et al., 2012;Jackson et al., 2013). W przypadku zastosowania laboratorium powinno wykazać biegłość w technikach zamrażania i potwierdzić dopuszczalne dolne zakresy procentowej zawartości DNA w ogonie w tkankach docelowych zwierząt, którym podawano nośnik, oraz możliwość wykrycia w dalszym ciągu reakcji dodatnich. W literaturze opisano zamrażanie tkanek różnymi metodami. Obecnie nie ma jednak zgody co do najlepszego sposobu zamrażania i rozmrażania tkanek oraz sposobu oceny, czy potencjalna zmiana w reakcji może mieć wpływ na czułość badania.

6. Ostatnie prace badawcze dowodzą, że należy spodziewać się dalszego skracania listy kluczowych zmiennych i precyzyjniejszego definiowania parametrów kluczowych zmiennych (Guerard *et al.*, 2014).

Bibliografia

(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*, t. 55/2, s. 114–121.

(2) Jackson, P. *et al.* (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, t. 28/6, s. 699–707.

(3) Lorenzo,Y.*et al.* (2013), **The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead,** *Mutagenesis*, t. 28/4, s. 427–432.

(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*, seria dotycząca badań i oceny nry 195 i 196, OECD Publishing, Paryż.

(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*, t. 53/2, s. 101–13.

▼M8

B.63. **BADANIE KLASYFIKACYJNE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCYJNEJ I ROZWOJOWEJ**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna wytycznej OECD dotyczącej badań (TG) nr 421 (2016). Okresowo dokonuje się przeglądu wytycznych OECD dotyczących badania substancji chemicznych pod kątem postępu naukowego. Pierwotna wytyczna dotycząca badań klasyfikacyjnych 421 została przyjęta w 1995 r. na podstawie protokołu „Wstępne badanie klasyfikacyjne toksyczności reprodukcyjnej (*Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test*)" omówionego na dwóch posiedzeniach ekspertów: w Londynie w 1990 r. (1) i w Tokio w 1992 r. (2).

2. Niniejsza metoda badawcza została zaktualizowana o właściwe punkty końcowe badania substancji zaburzającej funkcjonowanie układu hormonalnego w ramach działań następczych do działania o wysokim priorytecie podjętego przez OECD w 1998 r., mającego na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych dotyczących badań klasyfikacyjnych i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (3). Na przykład wytyczną dotyczącą badań nr OECD 407 (28-dniowe badanie toksyczności doustnej wywołanej powtarzanym dawkowaniem u gryzoni, rozdział B.7 niniejszego załącznika) wzbogacono w 2008 r. o parametry odpowiednie do wykrywania aktywności endokrynologicznej badanych substancji chemicznych. Celem aktualizacji wytycznej dotyczącej badań nr 421 było uwzględnienie niektórych właściwych punktów końcowych substancji zaburzającej funkcjonowanie układu hormonalnego w badaniach klasyfikacyjnych TG, gdzie okresy narażenia obejmują niektóre wrażliwe okresy w rozwoju (okresy przed lub wcześnie po urodzeniu).

3. Wybrane dodatkowe właściwe punkty końcowe badania substancji zaburzającej funkcjonowanie układu hormonalnego, stanowiące również część wytycznej dotyczącej badań 443 (Rozszerzone badanie toksyczności reprodukcyjnej w jednym pokoleniu, rozdział B.56 niniejszego załącznika), zostały włączone do wytycznej TG 421 na podstawie studium wykonalności dotyczącego kwestii naukowych i technicznych związanych z ich włączeniem, jak również możliwych dostosowań projektu badań potrzebnych do ich włączenia (4).

4. Niniejsza metoda badawcza ma na celu wygenerowanie ograniczonej ilości informacji dotyczących wpływu badanej substancji chemicznej na efektywność reprodukcyjną samców i samic, taką jak funkcja gonad, zachowanie kopulacyjne, zapłodnienie, rozwój jaja płodowego i poród. Nie jest ona metodą alternatywną dla istniejących metod badań B.31, B.34, B.35 lub B.56, ani ich nie zastępuje.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

5. Niniejsza metoda badania klasyfikacyjnego może być stosowana w celu dostarczenia wstępnych informacji na temat możliwego wpływu na reprodukcję lub rozwój, albo na wczesnym etapie oceny właściwości toksykologicznych substancji chemicznych lub na przedmiotowe substancje chemiczne. Może być również stosowana jako część zestawu wstępnych badań klasyfikacyjnych dla istniejących substancji chemicznych, w przypadku których dostępne są niewiele informacji toksykologicznych lub nie ma ich wcale, jako badanie ustalające zakres dawek dla bardziej ekstensywnych badań nad rozrodczością/rozwojem, lub w przypadku gdy jest to uznane za istotne w inny sposób. Przy prowadzeniu badania należy przestrzegać zasad i ustaleń określonych w dokumencie zawierającym wytyczne OECD nr 19 „Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations" (5) (Wytyczne dotyczące uznawania, oceny i wykorzystywania objawów klinicznych jako punktów humanitarnego zakończenia w odniesieniu do zwierząt doświadczalnych wykorzystywanych w ocenach bezpieczeństwa).

▼M8

6. Niniejsza metoda badawcza nie zapewnia pełnych informacji na temat wszystkich aspektów reprodukcji i rozwoju. W szczególności oferuje jedynie ograniczone środki wykrywania poporodowych przejawów narażenia prenatalnego lub skutków, które mogą być wywołane podczas narażenia postnatalnego. Ze względu (między innymi) na stosunkowo małą liczbę zwierząt w grupach dawkowania, selektywność punktów końcowych oraz krótki czas trwania badania, metoda ta nie dostarczy dowodów na definitywne stwierdzenie braku skutków. Ponadto wobec braku danych z innych badań toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, wyniki dodatnie są przydatne do wstępnej oceny zagrożeń i przyczyniają się do podejmowania decyzji dotyczących konieczności i terminów dodatkowych badań.

7. Wyniki uzyskane za pomocą parametrów związanych z układem hormonalnym należy rozpatrywać w kontekście dokumentu „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” („Ramy koncepcyjne OECD dotyczące testowania i oceny substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego”) (6). W niniejszych ramach koncepcyjnych rozszerzona wytyczna dotycząca badań OECD nr 421 zawarta jest na poziomie 4 jako test *in vivo* dostarczający danych na temat niekorzystnego wpływu na właściwe punkty końcowe w badaniu wpływu na układ hormonalny. Sygnał endokrynny może jednak nie być uważany za wystarczający dowód na to, że badana substancja chemiczna jest substancją zaburzającą funkcjonowanie układu hormonalnego.

8. Niniejsza metoda badawcza zakłada doustną drogę podawania badanej substancji chemicznej. W przypadku stosowania innych dróg narażenia, może być konieczne dokonanie modyfikacji.

9. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

10. Stosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

11. Badana substancja chemiczna podawana jest w stopniowanych dawkach kilku grupom samców i samic. Samce powinny otrzymywać dawki substancji przez co najmniej cztery tygodnie do dnia przed planowanym uśmierceniem włącznie (obejmuje to co najmniej dwa tygodnie przed kryciem, w okresie krycia i około dwóch tygodni po kryciu). Ze względu na ograniczone dawkowanie przed kryciem u samców, płodność może nie być szczególnie czułym wskaźnikiem toksyczności w odniesieniu do jąder. W związku z tym niezbędne jest szczegółowe badanie histologiczne jąder. Uważa się, że połączenie dwutygodniowego okresu dawkowania w okresie przed kojarzeniem i późniejszych obserwacji krycia/płodności z ogólnym okresem dawkowania wynoszącym co najmniej cztery tygodnie, po którym następuje szczegółowa histopatologia gonad samców, jest wystarczające do wykrycia większości wpływu na płodność i spermatogenezę samców.

12. Samice powinny otrzymywać dawki przez cały czas trwania badania. Obejmuje to dwa tygodnie przed kryciem (w celu objęcia co najmniej dwóch pełnych cykli estrogenowych), zmienny czas do zapłodnienia, czas trwania ciąży i co najmniej trzynaście dni po porodzie, do dnia planowanego uśmiercenia włącznie.

13. Czas trwania badania, po aklimatyzacji i ocenie cyklu estrogenowego przed dawkowaniem, zależy od efektywności samic i wynosi około 63 dni, [co najmniej 14 dni okresu przed kojarzeniem, (do) 14 dni krycia, 22 dni ciąży, 13 dni laktacji].

▼M8

14. Podczas okresu dawkowania każdego dnia zwierzęta są dokładnie obserwowane w celu wykrycia oznak toksyczności. Zwierzęta, które zginą lub zostaną uśmiercone w okresie badania, są poddawane autopsji, a zwierzęta, które przeżyją, są po zakończeniu badania uśmiercane i poddawane autopsji.

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

15. Niniejsza metoda badawcza jest przeznaczona do stosowania z wykorzystaniem szczurów. W przypadku gdy parametry określone w niniejszej metodzie badawczej badane są z wykorzystaniem innego gatunku gryzoni, należy podać uzasadnienie. Szczur był jedynym gatunkiem wykorzystywanym w międzynarodowym programie walidacyjnym dotyczącym substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego w wytycznej dotyczącej badań OECD nr 407 (odpowiadającej rozdziałowi B.7 niniejszego załącznika). Nie należy stosować szczepów o niskiej płodności lub powszechnie znanej wysokiej częstości występowania wad rozwojowych. Należy wykorzystać zdrowe zwierzęta dziewicze, które nie były wcześniej poddawane procedurom badawczym. Badane zwierzęta należy scharakteryzować z uwzględnieniem ich gatunku, szczepu, płci, masy i wieku. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała wykorzystywanych zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać 20 % średniej masy ciała u każdej z płci. W przypadku gdy badanie przeprowadza się jako badanie wstępne w stosunku do badania długoterminowego lub pełnopokoleniowego, zaleca się, aby w obu badaniach wykorzystywać zwierzęta tego samego szczepu i źródła.

Warunki utrzymywania i karmienia

16. Wszystkie procedury powinny być zgodne z lokalnymi normami utrzymywania zwierząt laboratoryjnych. Temperatura w pomieszczeniu, w którym przetrzymuje się zwierzęta doświadczalne, powinna wynosić 22 °C (± 3 °). Wilgotność względna, poza okresem sprzątania pomieszczenia, powinna wynosić co najmniej 30 % i raczej poniżej 70 %, należy starać się ją utrzymać na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne w cyklu 12 godzin z dostępem światła i 12 godzin bez dostępu światła. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Na wybór paszy może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej w przypadku podawania jej w ramach opisywanej metody.

17. Zwierzęta należy przetrzymywać razem, w małych grupach składających się z osobników tej samej płci; można je przetrzymywać pojedynczo, jeżeli ma to naukowe uzasadnienie. W przypadku przetrzymywania w grupach, w jednej klatce należy umieszczać nie więcej niż pięć zwierząt. Procedury krycia powinny być przeprowadzane w klatkach nadających się do tego celu. Ciężarne samice powinny być przetrzymywane w osobnych klatkach i mieć zapewnione materiały do budowy gniazda. Samice w okresie ciąży będą przebywać w indywidualnych klatkach ze swoim potomstwem.

18. Paszę należy regularnie analizować pod kątem obecności zanieczyszczeń. Próbkę paszy należy zachować do momentu ukończenia sprawozdania.

Przygotowanie zwierząt

19. Zdrowe młode dorosłe osobniki zwierząt są losowo przydzielane do grup kontrolnych oraz grup poddawanych działaniu substancji. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Zwierzęta są identyfikowane jednoznacznie i przetrzymywane w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem badania, żeby umożliwić aklimatyzację do warunków laboratoryjnych.

Przygotowanie dawek

20. Zaleca się, aby badana substancja chemiczna była podawana doustnie, chyba że za bardziej odpowiednią uzna się inną drogę podawania. W przypadku wybrania doustnej drogi podawania, badaną substancję chemiczną zazwyczaj podaje się za pomocą sondy; można jednak również zastosować metodę alternatywną polegającą na podaniu badanych substancji chemicznych w paszy lub w wodzie do picia.

▼M8

21. W razie potrzeby badaną substancję chemiczną rozpuszcza się lub przygotowuje jako zawiesinę w odpowiednim nośniku. Zaleca się, w miarę możliwości, najpierw rozważyć zastosowanie roztworu wodnego/zawiesiny, następnie roztworu/emulsji w oleju (np. z zastosowaniem oleju kukurydzianego), a potem możliwego roztworu w innych nośnikach. W przypadku nośników innych niż woda właściwości toksyczne tego nośnika powinny być znane. Należy określić stabilność i jednorodność badanej substancji chemicznej w nośniku.

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

22. Zaleca się, aby w każdej grupie na początku znajdowało się co najmniej 10 samców i 12–13 samic. Ocena samic będzie prowadzona przed narażeniem pod kątem cykliczności estrogenowej, a do badania nie zostaną włączone zwierzęta, które nie wykażą typowych 4–5 dniowych cykli; w związku z tym zaleca się zastosowanie dodatkowych samic w celu uzyskania 10 samic w każdej grupie. Poza przypadkiem, w którym występują wyraźne efekty toksyczne, oczekuje się, że zapewni to co najmniej 8 ciężarnych samic na grupę, co zazwyczaj stanowi najniższą dopuszczalną liczbę ciężarnych samic na grupę. Celem jest wyprodukowanie odpowiedniej liczby ciąż i potomstwa w celu zapewnienia znaczącej oceny wpływu badanej substancji chemicznej na płodność, ciążę, zachowanie macierzyńskie i zwierząt ssących oraz wzrost i rozwój potomstwa F_1 w okresie od chwili poczęcia do 13 dnia po porodzie.

Dawkowanie

23. Zasadniczo należy wykorzystać co najmniej trzy grupy badane i jedną grupę kontrolną. Poziomy dawek mogą opierać się na informacjach z badań dotyczących ostrej toksyczności lub na wynikach badań wielokrotnej dawki. Z wyjątkiem podawania badanej substancji chemicznej zwierzęta w grupie kontrolnej należy traktować w identyczny sposób jak zwierzęta w grupie badanej. Jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej jest stosowany nośnik, grupa kontrolna powinna otrzymać największą użytą objętość nośnika.

24. Poziomy dawki powinny być wybierane, biorąc pod uwagę jakiekolwiek istniejące dostępne dane o toksyczności i dane toksykokinetczne. Należy także wziąć pod uwagę, że mogą istnieć różnice w czułości między zwierzętami w ciąży a tymi niebędącymi w ciąży. Należy wybrać taki najwyższy poziom dawkowania, który powoduje oznaki toksyczności, ale nie powoduje śmierci lub silnego cierpienia. Następnie należy dobierać poziomy dawkowania w sekwencji malejącej w taki sposób, aby ukazać wszystkie reakcje powiązane z dawkowaniem i brak obserwowanych szkodliwych zmian przy najmniejszym poziomie dawkowania (NOAEL). Często do ustalenia malejących poziomów dawkowania optymalne jest zastosowanie poziomów dawkowania różniących się od dwu- do czterokrotnie, a zamiast stosować bardzo odległe (np. różniące się więcej niż 10-krotnie) poziomy dawkowania, często lepiej jest dodać czwartą grupę badaną.

25. Jeśli obserwowana jest ogólna toksyczność (np. spadek masy ciała, wpływ na wątrobę, serce, płuca lub nerki itp.) bądź inne zmiany, które nie muszą być efektami toksycznymi (np. zmniejszone pobieranie pokarmu, powiększenie wątroby), należy zachować ostrożność interpretując obserwowane skutki w punktach końcowych wpływu na układ hormonalny.

Badanie graniczne

26. Jeżeli badanie z podawaniem doustnym przy jednym poziomie dawki równym co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała/dzień lub, w przypadku podawania w paszy lub w wodzie do picia, równoważny procent w paszy lub wodzie do picia, stosując procedury opisane dla tego badania, nie wywołuje widocznych objawów zatrucia i jeżeli nie należałoby spodziewać się toksyczności na podstawie danych, dotyczących substancji strukturalnie pokrewnych, wtedy pełne badanie przy użyciu szeregu poziomów dawki może nie być konieczne. Ten test graniczny stosuje się z wyjątkiem przypadków, w których ekspozycja ludzi wskazuje na konieczność użycia wyższego poziomu dawki doustnej. W odniesieniu do innych dróg podawania, na przykład wziewnej lub stosowania na skórę, fizyczne własności chemiczne badanych substancji chemicznych mogą często wyznaczać najwyższe możliwe do osiągnięcia stężenie.

▼M8

Podawanie dawek

27. Zwierzętom podaje się badaną substancję chemiczną codziennie, przez siedem dni w tygodniu. Gdy badana substancja chemiczna jest podawana przez sondę, należy ją podawać zwierzętom w pojedynczej dawce przy użyciu sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Maksymalna objętość płynu, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można użyć 2 ml/100 g masy ciała. Poza drażniącymi lub żrącymi badanymi substancjami chemicznymi, które zwykle dają zaostrzone objawy przy wyższych stężeniach, zmienność objętości w badaniu powinna być zminimalizowana przez dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość przy wszystkich poziomach dawki.

28. W przypadku substancji chemicznych podawanych z paszą lub wodą do picia należy dopilnować, aby ilości podawanej badanej substancji chemicznej nie zakłócały zwykłego odżywiania lub gospodarki wodnej organizmu. Przy podawaniu badanej substancji chemicznej wraz z pokarmem można zastosować stałe stężenie w pokarmie (ppm) lub też stały poziom dawki w zależności do masy ciała zwierzęcia; należy podać zastosowany wariant. W przypadku badanej substancji chemicznej podawanej przez sondę, dawka powinna być podawana każdego dnia o podobnej porze i w razie konieczności modyfikowana co najmniej raz na tydzień, aby utrzymać stały poziom dawki w zależności od masy ciała zwierzęcia.

Harmonogram doświadczalny

29. Podawanie dawek substancji obu płciom powinno rozpocząć się co najmniej 2 tygodnie przed kryciem, po zaaklimatyzowaniu się osobników przez co najmniej pięć dni i poddaniu samic badaniu przesiewowemu pod kątem normalnych cykli estrogenowych (w dwa tygodnie przed okresem poddawania działaniu substancji). Badanie powinno być zaprogramowane w taki sposób, żeby ocena cyklu estrogenowego rozpoczynała się zaraz po osiągnięciu przez zwierzęta pełnej dojrzałości płciowej. Pod tym względem mogą występować nieznaczne różnice u różnych szczepów szczurów wykorzystywanych w różnych laboratoriach, np. szczury szczepu Sprague Dawley osiągają dojrzałość płciową po 10 tygodniach życia, a szczepu Wistar – po około 12 tygodniach. Matki posiadające potomstwo należy uśmiercić 13. dnia po porodzie lub wkrótce po tym dniu. Dzień narodzin (tj. dzień zakończenia porodu) określa się jako dzień 0 po porodzie. Samice, u których nie zaobserwowano oznak kopulacji, uśmierca się po 24–26 dniach od ostatniego dnia okresu krycia. Dawkowanie należy kontynuować u obu płci przez okres krycia. Dawkowanie u samców należy nadal stosować po okresie krycia co najmniej do zakończenia minimalnego łącznego okresu dawkowania wynoszącego 28 dni. Następnie samce są uśmiercane lub ewentualnie zatrzymywane i kontynuuje się dawkowanie w celu ewentualnego drugiego krycia, jeśli uzna się to za stosowne.

30. Codziennie dawkowanie u rodzicielskich samic powinno dalej trwać przez cały okres ciąży, co najmniej do 13. dnia po porodzie włącznie, lub do dnia poprzedzającego uśmiercenie. W przypadku badań, w których badaną substancję chemiczną podaje się drogą wziewną lub skórną, dawkowanie powinno trwać co najmniej do 19. dnia ciąży włącznie i powinno być ono wznowione najszybciej jak to możliwe – nie później niż w czwartym dniu po urodzeniu.

31. Diagram przedstawiający harmonogram doświadczenia znajduje się w dodatku 2.

Procedura krycia

32. Podczas tego badania należy zazwyczaj wykorzystywać krycia 1:1 (jeden samiec na jedną samicę). W przypadku wystąpienia sporadycznych zgonów samców mogą pojawić się wyjątki. Samicę należy umieścić razem z tym samym samcem na okres trwający do momentu odnotowania kopulacji lub dwa tygodnie. Każdego dnia rano samice należy poddać badaniu na obecność plemników lub czopa pochwowego. Dzień 0 ciąży określa się jako dzień, w którym potwierdzono wystąpienie krycia (wykrycie czopa pochwowego lub plemników). Jeśli kojarzenie w parze nie uda się, można rozważyć krycie samic samcami o dowiedzionej płodności.

▼M8

Liczebność miotu

33. Czwartego dnia po porodzie można skorygować liczebność każdego miotu, eliminując dodatkowe, losowo wybrane młode w miocie, by otrzymać, na ile to możliwe, cztery lub pięć samic i cztery lub pięć samców na miot, w zależności od typowej liczebności miotów w szczepie wykorzystanych szczurów. Próbki krwi należy pobrać od dwóch młodych nieprzydzielonych do żadnej kohorty, zebrać i wykorzystać do określenia poziomów surowicy T4. Wybiórcza eliminacja młodych, np. na podstawie masy ciała lub odległości anogenitalnej jest nieodpowiednia. Ilekroć liczba młodych samców lub samic uniemożliwia uzyskanie czterech lub pięciu osobników każdej płci na miot, dopuszczalne jest częściowe dostosowanie (na przykład sześć samców i cztery samice). Żadne młode nie zostanie wyeliminowane, gdy liczebność miotu spadnie poniżej celu eliminacji (8 lub 10 młodych/miot) Jeżeli dostępne jest tylko jedno młode powyżej celu eliminacji, tylko jedno młode zostanie wyeliminowane i wykorzystane do pobrania krwi do ewentualnej oceny surowicy T4.

34. Jeżeli liczebność miotu nie została skorygowana, dwa młode na miot uśmierca się 4. dnia po urodzeniu, a próbki krwi pobiera się do pomiaru stężeń hormonów tarczycy w surowicy. Jeżeli to możliwe, dwa młode na miot powinny stanowić młode samice, aby zachować młode samce na potrzeby oceny zatrzymywania płynu w brodawkach sutkowych, oprócz przypadku, w którym eliminacja tych młodych powoduje, że nie pozostaną żadne samice do oceny końcowej przy uśmiercaniu. Żadne młode nie zostanie wyeliminowane, gdy rozmiar miotu spadnie poniżej 8 lub 10 młodych/miot (w zależności od typowego rozmiaru miotu w szczepie wykorzystanych szczurów). Jeżeli dostępne jest tylko jedno młode powyżej typowej liczebności miotu, tylko jedno młode zostanie wyeliminowane i wykorzystane do pobrania krwi do ewentualnej oceny surowicy T4.

Obserwacje w trakcie życia

Obserwacje kliniczne

35. W trakcie okresu badania ogólne obserwacje kliniczne należy przeprowadzać co najmniej raz dziennie, a w przypadku zaobserwowania oznak toksyczności należy zwiększyć ich częstotliwość. Najlepiej prowadzić je każdego dnia o tej samej porze, biorąc pod uwagę szczytowy okres przewidywanych objawów po dawkowaniu. Należy odnotować zmiany w zachowaniu mające związek z badaniami, objawy trudnego lub długotrwałego porodu oraz wszelkie objawy toksyczności, włączając śmiertelność. Zapisy te powinny zawierać czas pojawienia się, stopień ciężkości i czas trwania objawów toksyczności.

Masa ciała i spożycie pokarmu/wody

36. Samce i samice należy zważyć w pierwszym dniu dawkowania, a następnie co najmniej raz tygodniowo oraz w momencie zakończenia dawkowania. Samice w okresie ciąży należy ważyć w dniach 0, 7, 14 i 20 oraz w ciągu 24 godzin od porodu (w dniu 0 lub 1 po porodzie), a także co najmniej 4 i 13 dni po porodzie. Obserwacje te należy umieścić w sprawozdaniu oddzielnie w odniesieniu do każdego dorosłego zwierzęcia.

37. Przed kryciem, w okresie ciąży oraz laktacji spożycie pokarmu należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu. W okresie krycia pomiar spożycia pokarmu nie jest obowiązkowy. Gdy badana substancja chemiczna podawana jest za pośrednictwem wody do picia, w trakcie tych okresów należy także mierzyć spożycie wody.

Cykle estrogenowe

38. Monitorowanie cykli estrogenowych powinno odbywać się przed rozpoczęciem poddawania działaniu substancji, aby do badania wybrać samice o regularnej cykliczności (zob. pkt 22). Należy także codziennie, od rozpoczęcia poddawania działaniu substancji do potwierdzenia krycia, monitorować rozmazy śluzówki pochwy. Jeżeli istnieje obawa związana z wystąpieniem

▼M8

dotkliwych skutków stresu mogących zmienić cykle estrogenowe wraz z rozpoczęciem dawkowania, laboratoria mogą przez dwa tygodnie narażać zwierzęta doświadczalne, a następnie przez co najmniej dwa tygodnie codziennie pobierać rozmazy śluzówki pochwy by monitorować cykl estrogenowy w trakcie okresu poprzedzającego krycie, ciągle monitorując go w okresie krycia, aż do momentu jego zaistnienia. Przy pozyskiwaniu komórek pochwy / szyjki macicy należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do zaburzeń błony śluzowej, które mogłyby wywoływać ciążę rzekomą (7)(8).

Parametry potomstwa

39. Począwszy od dnia 0 ciąży należy odnotowywać i liczyć czas jej trwania. Każdy miot należy zbadać tak szybko po urodzeniu jak to możliwe, w celu ustalenia liczby i płci młodych, płodów urodzonych martwo, płodów urodzonych żywo, słabowitych młodych w miocie (młodych o znacznie mniejszych rozmiarach niż odpowiadające młode kontrolne) oraz obecności poważnych nieprawidłowości.

40. Należy policzyć i ustalić płeć żywych młodych, a następnie zważyć mioty w ciągu 24 godzin od porodu (w dniu 0 lub 1. dniu po porodzie) oraz co najmniej 4. i 13. dnia po porodzie. W dodatku do obserwacji opisanych w pkt 35 należy odnotować wszelkie nieprawidłowe zachowania potomstwa.

41. Odległość anogenitalną każdego młodego należy mierzyć w tym samym dniu po urodzeniu – między 0. a 4. dniem po urodzeniu. W dniu pomiaru odległości anogenitalnej należy dokonać pomiaru masy ciała młodego, a odległość anogenitalną należy znormalizować w odniesieniu do pomiaru wielkości młodego, najlepiej jako pierwiastek kwadratowy masy ciała (9). Liczbę brodawek sutkowych / otoczek brodawek u młodych samców należy mierzyć, według zaleceń zawartych w wytycznej OECD nr 151, w 12. lub 13. dnia po urodzeniu (10).

Biochemia kliniczna

42. Próbki krwi z określonego miejsca pobiera się według następującego planu:

— od co najmniej dwóch młodych na miot 4. dnia po urodzeniu jeżeli liczba młodych na to pozwala (zob. pkt 33–34);

— od wszystkich matek oraz co najmniej dwóch młodych z każdego miotu przy zakończeniu badania 13. dnia; oraz

— od wszystkich dorosłych samców w dniu zakończenia badań.

Wszystkie próbki krwi przechowuje się w odpowiednich warunkach. Próbki krwi pobrane od 13. dniowych młodych oraz dorosłych samców ocenia się pod kątem poziomów surowicy hormonów tarczycy (T4). Jeżeli uzna się za stosowne, przeprowadzana jest dalsza ocena T4 w próbkach krwi od matek oraz 4. dniowych młodych. Można opcjonalnie przeprowadzić pomiar innych hormonów. Krew młodych z każdego miotu można połączyć do celów analizy hormonów tarczycy. Hormony tarczycy (T4 i TSH) zaleca się mierzyć jako „całkowite”.

43. Na zmienność i wartości bezwzględne stężeń przy oznaczaniu hormonów mogą mieć wpływ następujące czynniki:

— czas uśmiercenia zwierzęcia w związku z dobową zmiennością stężeń hormonów;

— metoda uśmiercenia zastosowana w celu uniknięcia zbędnego stresu dla zwierząt, mogącego wpłynąć na stężenia hormonów;

— zestawy do oznaczania hormonów, których krzywe standardowe mogą się różnić.

▼M8

44. Próbki osocza przeznaczone konkretnie do oznaczenia poziomu hormonów należy pobierać w porównywalnej porze dnia. Wartości liczbowe uzyskane w toku analizy stężeń hormonów różnią się w zależności od zastosowanego dostępnego w handlu zestawu testowego.

Patologia

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

45. W momencie uśmiercenia lub śmierci w okresie trwania badania dorosłe zwierzęta należy zbadać makroskopowo pod kątem nieprawidłowości lub zmian patologicznych. Szczególną uwagę należy zwrócić na organy układu rozrodczego. Należy odnotować liczbę miejsc zagnieżdżenia. Rozmazy śluzówki pochwy należy zbadać z rana w dniu autopsji, aby określić stadium cyklu estrogenowego oraz umożliwić korelację z histopatologią jajników.

46. Jądra i najądrza, a także gruczoł krokowy i kanaliki nasienne z całymi gruczołami koagulującymi wszystkich dorosłych samców należy, w stosownym przypadku, wyczyścić z wszelkich przylegających tkanek, a ich mokrą masę, a ich mokrą masę należy pobrać jak najszybciej po dysekcji, aby zapobiec jej wyschnięciu. Ponadto opcjonalne masy narządów mogą w przypadku samców obejmować zespół mięśni dźwigacza odbytu i mięśni opuszkowo-jamistych, gruczoły Cowpera i żołądź, a w przypadku samic parę jajników (mokra masa) i macicę (wraz z szyjką); jeżeli są uwzględnione, masy te należy określić jak najszybciej po dysekcji.

47. Martwe młode i młode zabite 13. dnia po porodzie lub wkrótce potem należy co najmniej przebadać zewnętrznie z zachowaniem ostrożności pod kątem poważnych nieprawidłowości. Szczególną uwagę należy zwrócić na zewnętrzne narządy rozrodcze, które należy zbadać pod kątem zmian rozwojowych. W 13. dniu należy zachować tarczycę jednego samca i jednej młodej samicy na miot.

48. Należy zachować jajniki, jądra, płciowe narządy dodatkowe (macicę wraz z szyjką, najądrza, gruczoł krokowy, kanaliki nasienne i gruczoły koagulujące), tarczycę i wszystkie narządy wykazujące makroskopowe zmiany patologiczne wszystkich dorosłych zwierząt. Do rutynowych badań jąder i najądrzy nie zaleca się utrwalania w formalinie. Akceptowalną metodą w przypadku tych tkanek jest wykorzystanie utrwalacza Bouina lub zmodyfikowanego utrwalacza Davidsona (11). Błonę białawą trzeba delikatnie i płytko przekłuć igłą na obu biegunach narządu w celu umożliwienia szybkiego wniknięcia płynu utrwalającego.

Histopatologia

49. Należy wykonać szczegółowe badanie histologiczne jajników, jąder i najądrzy (ze szczególnym naciskiem na stadia spermatogenezy i histopatologię śródmiąższowej struktury komórek jąder) zwierząt znajdujących się w grupie otrzymującej najwyższą dawkę oraz zwierząt znajdujących się w grupie kontrolnej. Można w razie potrzeby zbadać pozostałe zachowane organy, w tym tarczyce pochodzące od młodych i dorosłych zwierząt. Masę tarczycy można określić po utrwaleniu. Należy zachować dużą ostrożność przy okrawaniu i wykonywać je dopiero po utrwaleniu, w celu uniknięcia uszkodzenia tkanek. Mogłoby ono zakłócić analizę histopatologiczną. Badania powinny być rozciągnięte na inne grupy badane, gdy w grupie otrzymującej najwyższe dawki obserwuje się zmiany. W wytycznych dotyczących histopatologii (11) podano dodatkowe informacje dotyczące wycinania, utrwalania, dzielenia i histopatologii tkanek układu hormonalnego.

▼M8

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

50. Należy podać dane każdego zwierzęcia. Ponadto wszystkie dane należy podsumować w formie tabeli wykazującej, w odniesieniu do każdej grupy badanej i każdego pokolenia, liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które znaleziono martwe podczas badania lub zwierząt uśmierconych ze względów humanitarnych, czas śmierci lub humanitarnego uśmiercenia, liczbę zwierząt płodnych, liczbę ciężarnych samic, liczbę zwierząt wykazujących zaobserwowane oznaki toksyczności, z podaniem czasu ich pojawienia się, w tym czasu trwania, ciężkości wszelkich skutków toksyczności, rodzajów zmian histopatologicznych oraz wszelkich odnośnych danych miotów. W dodatku 3 przedstawiono podsumowanie w formie tabeli, które okazało się być bardzo przydatne przy ocenianiu efektu reprodukcyjnego/rozwojowego.

51. Ze względu na ograniczone wymiary badania, analizy statystyczne w postaci testów na „istotność" mają ograniczoną wartość dla wielu punktów końcowych, zwłaszcza reprodukcyjnych punktów końcowych. Jeżeli wykorzystywane są analizy statystyczne, wybrana metoda powinna być odpowiednia dla rozkładu badanej zmiennej i powinna być wybrana przed rozpoczęciem badania. Analiza statystyczna odległości anogenitalnej i zatrzymywania płynu w brodawkach powinna być oparta na danych dotyczących poszczególnych młodych z uwzględnieniem wpływu na miot. W stosownych przypadkach za jednostkę analityczną uznaje się miot. Analiza statystyczna masy ciała młodych powinna być oparta na danych dotyczących poszczególnych młodych z uwzględnieniem liczebności miotu. Ze względu na małą wielkość grupy, wykorzystanie historycznych danych dotyczących kontroli (np. dotyczących wielkości miotu), w przypadku gdy są one dostępne, może być również przydatne jako pomoc w interpretacji badania.

Ocena wyników

52. Wyniki tego badania toksyczności powinny być oceniane w kategoriach zaobserwowanych skutków, wyników autopsji i badań mikroskopowych. Ocena obejmuje zależność pomiędzy dawką badanej substancji chemicznej a obecnością lub brakiem, częstością i ciężkością nieprawidłowości, w tym poważnych zmian patologicznych, wskazanymi organami docelowymi, bezpłodnością, nieprawidłowościami klinicznymi, zmienionymi funkcjami rozrodczymi i funkcjonowaniem miotów, zmianami masy ciała, wpływem na śmiertelność i wszelkimi innymi skutkami toksycznymi.

53. Ze względu na krótki okres poddania działaniu substancji w odniesieniu do samców, przy ocenie wpływu na rozrodczość u samców należy uwzględnić histopatologię jąder i najądrzy oraz dane dotyczące płodności. Wykorzystanie historycznych danych dotyczących kontroli odnoszących się do reprodukcji/rozwoju (np. dotyczących wielkości miotu, odległości anogenitalnej, zatrzymywania płynu w brodawkach, poziomu T4 w surowicy), w przypadku gdy są one dostępne, może być również przydatne jako pomoc w interpretacji badania.

54. Proponuje się, aby do celów kontroli jakości zbierać historyczne dane kontrolne i obliczać współczynniki zmienności dla danych liczbowych, szczególnie w odniesieniu do parametrów związanych z wykrywaniem substancji zakłócających funkcjonowanie układu hormonalnego. Dane te można wykorzystać do celów porównawczych przy ocenie bieżących badań.

Sprawozdanie z badania

55. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli są znane;

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana.

▼**M8**

substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Nośnik (w stosownych przypadkach):

— uzasadnienie wyboru nośnika, jeśli jest inny niż woda.

Zwierzęta doświadczalne:

— wykorzystany gatunek/szczep;

— liczba, wiek i płeć zwierząt;

— źródło pochodzenia, warunki utrzymywania, pasza itp.;

— masa ciała poszczególnych zwierząt na początku badania;

— uzasadnienie wyboru gatunku, jeśli jest inny niż szczur.

Warunki badania:

— uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania;

— szczegóły dotyczące postaci użytkowej badanej substancji chemicznej/ przygotowania pokarmu, osiągnięte stężenie, stabilność i jednorodność preparatu;

— szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej;

— wskaźnik konwersji stężenia badanej substancji chemicznej w pokarmie / wodzie pitnej (ppm) do dawki rzeczywistej (mg/kg masy ciała/dzień), jeśli ma to zastosowanie;

— szczegółowe informacje dotyczące jakości pokarmu i wody;

— szczegółowy opis procedury randomizacji stosowanej do doboru młodych do eliminacji w przypadku, gdy się jej dokonuje.

Wyniki:

— masa ciała / zmiany masy ciała,

— spożycie pokarmu, spożycie wody (jeżeli dane są dostępne);

— dane dotyczące efektu toksycznego ze względu na płeć i dawkę, włączając płodność, ciążę i wszelkie inne objawy toksyczności;

— długość trwania ciąży;

— skutki toksyczne lub inne wywierane na reprodukcję, potomstwo, wzrost pourodzeniowy itp.;

— rodzaj, nasilenie i czas trwania obserwowanych objawów klinicznych (tak odwracalnych, jak i nieodwracalnych);

— liczba dorosłych samic, u których występuje normalny lub nienormalny cykl estrogenowy i czas trwania cyklu;

— liczba młodych urodzonych żywo i strat poimplantacyjnych,

— dane dotyczące masy ciała młodego;

— odległość anogenitalna u wszystkich młodych (oraz masa ciała na dzień pomiaru odległości anogenitalnej);

▼M8

— zatrzymywanie płynu w brodawkach u młodych płci męskiej;

— poziom hormonów tarczycy, młode w 13. dniu żucia i dorosłe samce (oraz matki i młode w 4. dniu życia, jeśli dokonano pomiaru)

— liczba młodych z wyraźnie widocznymi nieprawidłowościami, ocena wzrokowa zewnętrznych narządów płciowych, liczba słabowitych młodych w miocie;

— czas zgonu podczas badania lub informacja o tym, czy zwierzęta przetrwały do czasu zakończenia badania;

— liczba zagnieżdżeń, liczebność miotu i masa poszczególnych młodych w miocie w momencie rejestracji;

— masa ciała w chwili uśmiercenia oraz masa narządów u zwierząt rodzicielskich;

— wyniki autopsji;

— szczegółowy opis wyników badania histopatologicznego;

— dane dotyczące absorpcji (jeżeli są dostępne);

— w stosownych przypadkach statystyczne opracowanie wyników.

Omówienie wyników.

Wnioski

Interpretacja wyników

56. Badanie dostarczy ocen toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej związanej z zastosowaniem powtarzanego dawkowania (zob. pkt 5 i 6). Może ono stanowić wskazówkę co do potrzeby prowadzenia dalszych badań i stanowić wskazówkę przy projektowaniu kolejnych badań. Przy interpretowaniu wyników dotyczących rozrodczości i rozwoju pomocny może być dokument zawierający wytyczne OECD nr 43 (12). Wytyczne OECD nr 106 w sprawie oceny histologicznej badań endokrynologicznych i reprodukcyjnych u gryzoni („OECD Guidance Document No 106 on Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents") (11) zawierają informacje na temat przygotowania i oceny narządów (endokrynologicznych) i rozmazów śluzówki pochwy, które mogą być pomocne w odniesieniu do tej wytycznej dotyczącej badań.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1990). *Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee*. Dokument dostępny na wniosek w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju w Paryżu.

(2) OECD (1992). *Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods*, Tokio, 27–29 października 1992 Dokument dostępny na wniosek w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju w Paryżu.

(3) OECD (1998). *Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force*, 10–11 marca 1998 r. Dokument dostępny na wniosek w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju w Paryżu.

(4) OECD (2015). *Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints*. [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 217). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(5) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations.* [w:] seria dotycząca badań i oceny nr 19. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

▼**M8**

(6) OECD (2011). *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*. [w:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 150. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. i Cooper R.L. (2007). *The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies*. „Birth Defects Research" część B nr 80 (2), s. 84–97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). *Cycles and Seasons*, w: C.R. Auston i R.V. Short, (red.), *Reproduction in Mammals*, t. 1 *Germ Cells and Fertilization*. Cambridge, Nowy Jork.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. i Reynolds V.L.(1999). *Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights*. „Reproductive Toxicology" nr 13, s. 383–390.

(10) OECD (2013). *Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study,* [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 151). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(11) OECD (2009). *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents*. [w:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 106. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(12) OECD (2008). *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*. [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 43). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

▼**M8**

Dodatek 1

DEFINICJE (ZOB. RÓWNIEŻ WYTYCZNA OECD NR 150 (6))

Działanie androgenowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu androgenowego (np. testosteronu) w organizmach ssaków.

Działanie antyandrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu androgenowego (np. testosteronu) w organizmach ssaków.

Działanie antyestrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu estrogenowego (np. 17ß-estradiolu) w organizmach ssaków.

Działanie antytyroidowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu tarczycy (np. T_3) w organizmach ssaków.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Toksyczność rozwojowa: objawy toksyczności reprodukcyjnej, reprezentującej zaburzenia przedporodowe, okołoporodowe, poporodowe, strukturalne lub czynnościowe u potomstwa.

Dawkowanie jest terminem ogólnym obejmującym dawkę, częstotliwość i czas trwania dawkowania.

Dawka jest to ilość podawanej badanej substancji chemicznej. Dawkę wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej na jednostkę masy ciała zwierzęcia doświadczalnego na dzień (np. mg/kg masy ciała/dzień) lub jako stałe stężenie w diecie.

Wyraźna toksyczność jest to określenie ogólne opisujące wyraźne oznaki toksyczności występujące po podaniu badanej substancji chemicznej. Powinny one być wystarczające do oceny ryzyka i mieć taki charakter, że można oczekiwać, iż zwiększenie podawanej dawki spowoduje pojawienie się silnych oznak toksyczności i prawdopodobną śmiertelność.

Upośledzenie płodności oznacza zaburzenie funkcji reprodukcyjnych lub zdolności reprodukcyjnych samców lub samic.

Toksyczność matczyna: niekorzystny skutek dla ciężarnych samic, występujący swoiście (skutek bezpośredni) lub nieswoiście (skutek pośredni).

NOAEL jest to skrót oznaczający poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian. Jest to najwyższy poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych efektów związanych z podawaniem substancji na skutek jej podawania.

Działanie estrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu estrogenowego (np. 17ß-estradiolu) w organizmach ssaków.

Toksyczność reprodukcyjna oznacza szkodliwy wpływ na potomstwo lub upośledzenie funkcji lub zdolności reprodukcyjnych u samców i samic.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

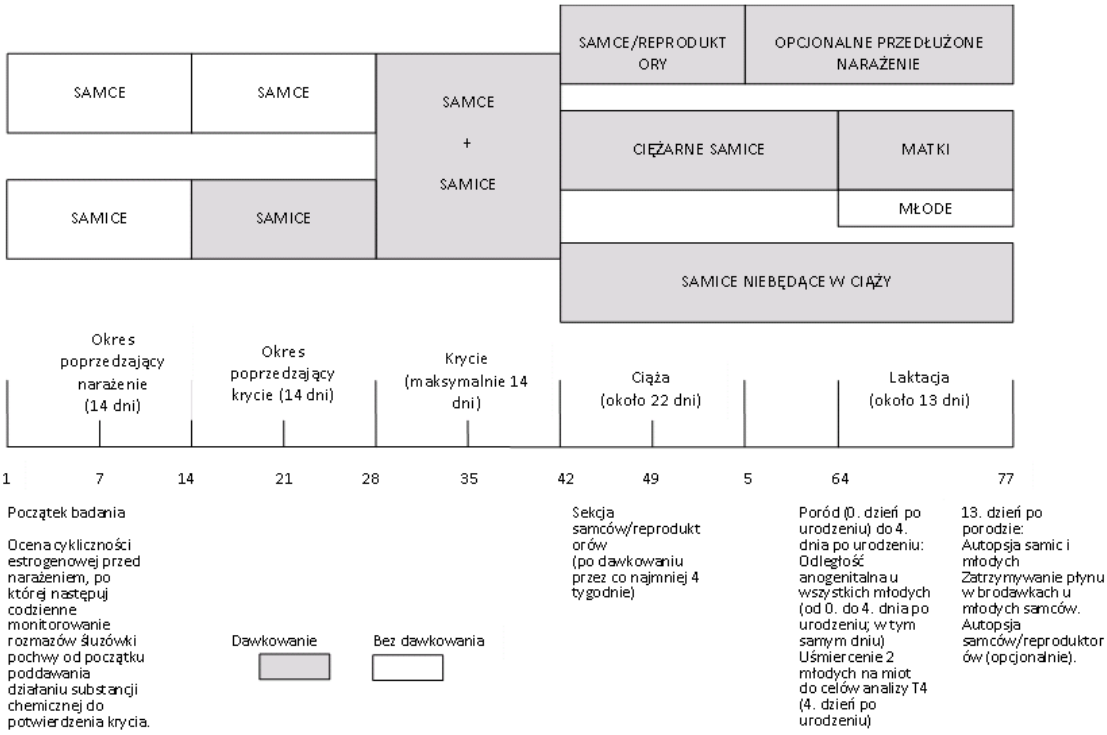
Działanie tyroidowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu tarczycy (np. T_3) w organizmach ssaków.

Walidacja jest to proces naukowy mający na celu scharakteryzowanie wymogów operacyjnych i ograniczeń metody badawczej i wykazanie jej wiarygodności oraz odpowiedniości do danego celu.

▼**M8**

Dodatek 2

SCHEMAT EKSPERYMENTALNEGO PLANU WSKAZUJĄCY MAKSYMALNY CZAS TRWANIA BADANIA, OPARTY NA PEŁNYM 14-DNIOWYM OKRESIE KRYCIA



▼**M8**

Dodatek 3

TABELARYCZNE SPRAWOZDANIE PODSUMOWUJĄCE WPŁYW NA REPRODUKCJĘ/ROZWÓJ

OBSERWACJE	WARTOŚCI				
Dawkowanie (jednostki)	0 (kontrola)	…	…	…	…
Zapoczątkowane pary (N)					
Cykl estrogenowy (co najmniej średnia długość i częstość występowania nieregularnych cykli)					
Samice wykazujące oznaki kopulacji (N)					
Samice zachodzące w ciążę (N)					
Dni poczęcia 1–5 (N)					
Dni poczęcia 6–… ([1]) (N)					
Ciąża ≤ 21 dni (N)					
Ciąża = 22 dni (N)					
Ciąża ≥ 23 dni (N)					
Matki z urodzonymi żywymi młodymi (N)					
Matki z żywymi młodymi w 4. dniu po porodzie (N)					
Implanty/matka (średnia)					
Żywe młode/matkę przy porodzie (średnia)					
Żywe młode/matka w 4 dniu (średnia)					
Proporcja płci (samiec/samica) przy porodzie (średnia)					
Proporcja płci (samiec/samica) w 4 dniu (średnia)					
Masa miotu przy porodzie (średnia)					
Masa miotu w 4 dniu (średnia)					
Masa ciała młodego przy porodzie (średnia)					
Masa ciała młodego przy pomiarze odległości anogenitalnej (średnia dla samców, średnia dla samic)					

▼**M8**

OBSERWACJE	WARTOŚCI				
Dawkowanie (jednostki)	0 (kontrola)	…	…	…	…
Odległość anogenitalna młodego w tym samym dniu po urodzeniu, urodzenie – 4. dzień (średnia dla samców, średnia dla samic, zaznaczyć dzień po urodzeniu)					
Masa ciała młodego w 4 dniu (średnia)					
Zatrzymywanie płynu w brodawkach u młodych płci męskiej w 13 dniu (średnia)					
Masa ciała młodego w 13 dniu (średnia)					
MŁODE Z ZABURZENIAMI					
Matki z 0					
Matki z 1					
Matki z ≥ 2					
UTRATA POTOMSTWA					
Przedurodzeniowe/postimplantacyjne (implantacje minus żywe urodzenia)					
Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice z ≥ 3					
Pourodzeniowe (żywe urodzenia minus żywe 13. dnia po urodzeniu)					
Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice z ≥ 3					

([1]) ostatni dzień okresu krycia

▼M8

B.64 POŁĄCZONE BADANIE Z UŻYCIEM DAWKI POWTARZANEJ I BADANIE KLASYFIKACYJNE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCYJNEJ/ROZWOJOWEJ

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej dotyczącej badań OECD nr 422 (2016). Okresowo dokonuje się przeglądu wytycznych OECD dotyczących badania substancji chemicznych pod kątem postępu naukowego. Pierwotna wytyczna dotycząca badań klasyfikacyjnych nr 422 została przyjęta w 1996 r. na podstawie protokołu „Połączone badanie z użyciem dawki powtarzanej i badanie klasyfikacyjne reprodukcyjne/rozwojowe (Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Screening Test)" omówionego na dwóch posiedzeniach ekspertów: w Londynie w 1990 r. (1) i w Tokio w 1992 r. (2).

2. Niniejsza metoda badawcza łączy część dotyczącą badań klasyfikacyjnych toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, która opiera się na doświadczeniu zdobytym w państwach członkowskich w związku ze stosowaniem pierwotnej metody w odniesieniu do istniejących substancji chemicznych produkowanych w dużych objętościach oraz w badaniach eksploracyjnych z substancjami służącymi do kontroli dodatniej (3) (4), oraz część dotyczącą badania toksyczności z użyciem dawki powtarzanej, zgodnie z wytyczną dotyczącą badań OECD nr 407 (28-dniowe badanie toksyczności doustnej wywołanej powtarzanym dawkowaniem u gryzoni, odpowiadająca rozdziałowi B.7 niniejszego załącznika).

3. Niniejsza metoda badawcza została zaktualizowana o właściwe punkty końcowe dotyczące substancji zaburzającej funkcjonowanie układu hormonalnego w ramach działań następczych do działania o wysokim priorytecie podjętego przez OECD w 1998 r., mającego na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych dotyczących badań klasyfikacyjnych i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (5). W tym kontekście wytyczną dotyczącą badań nr 407 (opowiadającą rozdziałowi B.7 niniejszego załącznika) wzbogacono w 2008 r. o parametry odpowiednie do wykrywania aktywności endokrynologicznej badanych substancji chemicznych. Celem aktualizacji wytycznej dotyczącej badań nr 422 było uwzględnienie niektórych właściwych punktów końcowych substancji zaburzającej funkcjonowanie układu hormonalnego w badaniach klasyfikacyjnych TG, gdzie okresy narażenia obejmują niektóre wrażliwe okresy w rozwoju (okresy przed lub wcześnie po urodzeniu).

4. Wybrane dodatkowe właściwe punkty końcowe dotyczące substancji zaburzającej funkcjonowanie układu hormonalnego, stanowiące również część wytycznej dotyczącej badań nr 443 (Rozszerzone badanie toksyczności reprodukcyjnej w jednym pokoleniu, odpowiadająca rozdziałowi B.56 niniejszego załącznika), zostały włączone do wytycznej dotyczącej badań nr 422 na podstawie studium wykonalności dotyczącego kwestii naukowych i technicznych związanych z ich włączeniem, jak również możliwych dostosowań projektu badań potrzebnych do ich włączenia (6).

5. Niniejsza metoda badawcza ma na celu wygenerowanie ograniczonej ilości informacji dotyczących wpływu badanej substancji chemicznej na efektywność reprodukcyjną samców i samic, taką jak funkcja gonad, zachowanie kopulacyjne, zapłodnienie, rozwój jaja płodowego i poród. Nie jest ona metodą alternatywną dla istniejących metod badań B.31, B.34, B.35 lub B.56, ani ich nie zastępuje.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

6. Przy szacowaniu i ocenie właściwości toksycznych badanej substancji chemicznej oznaczenie toksyczności doustnej przy zastosowaniu powtarzanego dawkowania można prowadzić po uzyskaniu początkowej informacji o toksyczności na podstawie badań toksyczności ostrej. Badanie to dostarcza informacji na temat możliwych zagrożeń dla zdrowia, które mogą wynikać z powtarzającego się narażenia przez stosunkowo ograniczony czas. Metoda obejmuje podstawowe badanie toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem, które można przeprowadzić w przypadku substancji chemicznych, dla których nie ma obowiązku wykonania badania 90-dniowego (np. wtedy, gdy wielkość produkcji nie przekracza pewnych limitów) lub jako badanie wstępne do badania długoterminowego. Przy prowadzeniu badania należy przestrzegać zasad i ustaleń określonych w dokumencie zawierającym wytyczne OECD nr 19 „Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations" (7) (Wytyczne dotyczące uznawania, oceny i wykorzystywania objawów klinicznych jako punktów humanitarnego zakończenia w odniesieniu do zwierząt doświadczalnych wykorzystywanych w ocenach bezpieczeństwa).

▼M8

7. Ponadto obejmuje ono badanie klasyfikacyjne toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, a zatem może być również wykorzystywane w celu dostarczenia wstępnych informacji na temat możliwych skutków dla sprawności reprodukcyjnej samców i samic, takich jak funkcja gonad, zachowanie kopulacyjne, zapłodnienie, rozwój jaja płodowego i poród, albo na wczesnym etapie oceny właściwości toksykologicznych badanych substancji chemicznych lub na przedmiotowe badane substancje chemiczne. Niniejsza metoda badawcza nie zapewnia pełnych informacji na temat wszystkich aspektów reprodukcji i rozwoju. W szczególności oferuje jedynie ograniczone środki wykrywania poporodowych przejawów narażenia prenatalnego lub skutków, które mogą być wywołane podczas narażenia postnatalnego. Ze względu (między innymi) na selektywność punktów końcowych oraz krótki czas trwania badania, metoda ta nie dostarczy dowodów na definitywne stwierdzenie braku skutków reprodukcyjnych/rozwojowych. Ponadto wobec braku danych z innych badań toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, wyniki dodatnie są przydatne do wstępnej oceny zagrożeń i przyczyniają się do podejmowania decyzji dotyczących konieczności i terminów dodatkowych badań.

8. Wyniki uzyskane za pomocą parametrów związanych z układem hormonalnym należy rozpatrywać w kontekście dokumentu „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” („Ramy koncepcyjne OECD dotyczące testowania i oceny substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego”) (8). W niniejszych ramach koncepcyjnych rozszerzona wytyczna dotyczącej badań OECD nr 422 zawarta jest na poziomie 4 jako test *in vivo* dostarczający danych na temat niekorzystnego wpływu na właściwe punkty końcowe dotyczące układu hormonalnego. Sygnał endokrynny może jednak nie być uważany za wystarczający dowód na to, że badana substancja chemiczna jest substancją zaburzającą funkcjonowanie układu hormonalnego.

9. Metoda badawcza kładzie również nacisk na objawy neurologiczne jako określony punkt końcowy, i podkreślana jest konieczność uważnych obserwacji klinicznych zwierząt, w celu otrzymania możliwie największej ilości informacji. Metoda ta powinna identyfikować chemikalia o potencjale neurotoksycznym, które mogą również dawać podstawy do dalszego dogłębnego badania tego aspektu. Ponadto metoda ta może również w podstawowym zakresie może wskazywać na skutki dla układu immunologicznego.

10. Wobec braku danych z innych badań toksyczności ogólnoustrojowej, toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, neurotoksyczności lub immunotoksyczności, wyniki dodatnie są przydatne do wstępnej oceny zagrożeń i przyczyniają się do podejmowania decyzji dotyczących konieczności i terminów dodatkowych badań. Badanie może być szczególnie użyteczne jako część Screening Information Data Set (SIDS) OECD do oceny istniejących substancji chemicznych, w odniesieniu do których istnieje niewiele lub nie ma dostępnych informacji toksykologicznych i może służyć jako metoda alternatywna dla przeprowadzenia dwóch oddzielnych badań, odpowiednio toksyczności z użyciem dawki powtarzanej (wytyczna dotycząca badań OCD nr 407, odpowiadająca rozdziałowi B.7 niniejszego załącznika) i toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej (wytyczna dotycząca badań OECD nr 421, odpowiadająca rozdziałowi B.63 niniejszego załącznika). Może być również stosowana jako badanie ustalające zakres dawek dla bardziej ekstensywnych badań nad rozrodczością/rozwojem, lub w przypadku gdy jest to uznane za istotne w inny sposób.

11. Zakłada się zasadniczo, że istnieją różnice w czułości między zwierzętami ciężarnymi a tymi niebędącymi w ciąży. W związku z tym określenie w ramach tego badania łączonego poziomów dawek, które wystarczają do oceny zarówno ogólnej toksyczności ogólnoustrojowej i specyficznej toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej, może być bardziej skomplikowane niż w przypadku przeprowadzenia indywidualnych badań odrębnie. Interpretacja wyników badania w odniesieniu do ogólnej toksyczności ogólnoustrojowej może być ponadto trudniejsze niż przeprowadzanie odrębnego badania dawki powtórzonej, w szczególności kiedy parametry dotyczące surowicy i histopatologii nie są poddane ocenie w tym samym punkcie czasu badania. Ze

▼M8

względu na te złożoności techniczne przeprowadzenie tego łączonego badania klasyfikacyjnego wymaga znacznego doświadczenia w badaniu toksyczności. Z drugiej strony badanie łączne może, poza wykorzystaniem mniejszej liczby osób, stanowić lepszy sposób odróżnienia bezpośrednich skutków dotyczących reprodukcji i rozwoju od tych, które są drugorzędne względem innych skutków (ogólnoustrojowych).

12. Okres dawkowania jest dłuższy w tym badaniu niż w standardowym 28-dniowym badaniu dawki powtórzonej. Wykorzystuje się w nim jednak mniej zwierząt obojga płci w poszczególnych grupach w porównaniu z sytuacją, w której przeprowadza się standardowe 28-dniowe badanie dawki powtórzonej poza badaniem klasyfikacyjnym toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej.

13. Niniejsza metoda badawcza zakłada doustną drogę podawania badanej substancji chemicznej. W przypadku stosowania innych dróg narażenia, może być konieczne dokonanie modyfikacji.

14. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

15. Stosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

16. Badana substancja chemiczna podawana jest w stopniowanych dawkach kilku grupom samców i samic. Samce powinny otrzymywać dawki przez co najmniej cztery tygodnie do dnia przed planowanym uśmierceniem włącznie (obejmuje to co najmniej dwa tygodnie przed kryciem, w okresie krycia i około dwóch tygodni po kryciu). Ze względu na ograniczone dawkowanie przed kryciem u samców, płodność nie może być szczególnie czułym wskaźnikiem toksyczności w odniesieniu do jąder. W związku z tym niezbędne jest szczegółowe badanie histologiczne jąder. Uważa się, że połączenie dwutygodniowego okresu dawkowania w okresie przed kojarzeniem i późniejszych obserwacji krycia/płodności z ogólnym okresem dawkowania wynoszącym co najmniej cztery tygodnie, po którym następuje szczegółowa histopatologia gonad samców, jest wystarczające do wykrycia większości wpływu na płodność i spermatogenezę samców.

17. Samice powinny otrzymywać dawki przez cały czas trwania badania. Obejmuje to dwa tygodnie przed kryciem (w celu objęcia co najmniej dwóch pełnych cykli estrogenowych), zmienny czas do zapłodnienia, czas trwania ciąży i co najmniej trzynaście dni po porodzie, do dnia planowanego uśmiercenia włącznie.

18. Czas trwania badania, po aklimatyzacji i ocenie cyklu estrogenowego przed dawkowaniem, zależy od efektywności samic i wynosi około 63 dni, [co najmniej 14 dni okresu przed kojarzeniem, (do) 14 dni krycia, 22 dni ciąży, 13 dni laktacji].

19. Podczas okresu dawkowania każdego dnia zwierzęta są dokładnie obserwowane w celu wykrycia oznak toksyczności. Zwierzęta, które zginą lub zostaną uśmiercone w okresie badania, są poddawane autopsji, a zwierzęta, które przeżyją, są po zakończeniu badania uśmiercane i poddawane autopsji.

▼M8

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

20. Niniejsza metoda badawcza jest przeznaczona do stosowania z wykorzystaniem szczurów. W przypadku gdy parametry określone w TG 422 badane są z wykorzystaniem innego gatunku gryzoni, należy podać uzasadnienie. Szczur był jedynym gatunkiem wykorzystywanym w międzynarodowym programie walidacyjnym dotyczącym substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego w oparciu o TG 407. Nie należy stosować szczepów o niskiej płodności lub powszechnie znanej wysokiej częstości występowania wad rozwojowych. Należy wykorzystać zdrowe zwierzęta dziewicze, które nie były wcześniej poddawane procedurom badawczym. Badane zwierzęta należy scharakteryzować z uwzględnieniem ich gatunku, szczepu, płci, masy i wieku. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała wykorzystywanych zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać ± 20 % średniej masy ciała u każdej z płci. W przypadku gdy badanie przeprowadza się jako badanie wstępne w stosunku do badania długoterminowego lub pełnopokoleniowego, zaleca się, aby w obu badaniach wykorzystywać zwierzęta tego samego szczepu i źródła.

Warunki utrzymywania i karmienia

21. Wszystkie procedury powinny być zgodne z lokalnymi normami utrzymywania zwierząt laboratoryjnych. Temperatura w pomieszczeniu, w którym przetrzymuje się zwierzęta doświadczalne, powinna wynosić 22 °C (± 3 °). Wilgotność względna, poza okresem sprzątania pomieszczenia, powinna wynosić co najmniej 30 % i najlepiej byłoby, gdyby utrzymywała się na poziomie 70 %. Oświetlenie powinno być sztuczne w cyklu 12 godzin z dostępem światła i 12 godzin bez dostępu światła. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Na wybór paszy może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej w przypadku podawania jej w ramach opisywanej metody.

22. Zwierzęta należy przetrzymywać razem, w małych grupach składających się z osobników tej samej płci; można je przetrzymywać pojedynczo, jeżeli ma to naukowe uzasadnienie. W przypadku przetrzymywania w grupach, w jednej klatce należy umieszczać nie więcej niż pięć zwierząt. Procedury krycia powinny być przeprowadzane w klatkach nadających się do tego celu. Ciężarne samice powinny być przetrzymywane w osobnych klatkach i mieć zapewnione materiały do budowy gniazda. Samice w okresie ciąży będą przebywać w indywidualnych klatkach ze swoim potomstwem.

23. Paszę należy regularnie analizować pod kątem obecności zanieczyszczeń. Próbkę paszy należy zachować do momentu ukończenia sprawozdania.

Przygotowanie zwierząt

24. Zdrowe młode dorosłe osobniki zwierząt wybiera się losowo i przypisuje do grup poddawanych działaniu substancji i do klatek. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Zwierzęta są identyfikowane jednoznacznie i przetrzymywane w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem badania, żeby umożliwić aklimatyzację do warunków laboratoryjnych.

Przygotowanie dawek

25. Zaleca się, aby badana substancja chemiczna była podawana doustnie, chyba że za bardziej odpowiednią uzna się inną drogę podawania. W przypadku wybrania doustnej drogi podawania, badaną substancję chemiczną zazwyczaj podaje się za pomocą sondy; można jednak również zastosować metodę alternatywną polegającą na podaniu badanych substancji chemicznych w paszy lub w wodzie do picia.

26. W razie potrzeby badaną substancję chemiczną rozpuszcza się lub przygotowuje jako zawiesinę w odpowiednim nośniku. Zaleca się, w miarę możliwości, najpierw rozważyć zastosowanie roztworu wodnego/zawiesiny, następnie roztworu/zawiesiny w oleju (np. z zastosowaniem oleju kukurydzianego), a potem możliwego roztworu w innych nośnikach. W przypadku zastosowania nośników niewodnych właściwości toksyczne danego nośnika powinny być znane. Należy określić stabilność i jednorodność badanej substancji chemicznej w nośniku.

▼M8

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

27. Zaleca się, aby w każdej grupie na początku znajdowało się co najmniej 10 samców i 12–13 samic. Ocena samic będzie prowadzona przed narażeniem pod kątem cykliczności estrogenowej, a do badania nie zostaną włączone zwierzęta, które nie wykażą typowych 4–5 dniowych cykli; w związku z tym zaleca się zastosowanie dodatkowych samic w celu uzyskania 10 samic w każdej grupie. Poza przypadkiem, w którym występują wyraźne efekty toksyczne, oczekuje się, że zapewni to co najmniej 8 ciężarnych samic na grupę, co zazwyczaj stanowi najniższą dopuszczalną liczbę ciężarnych samic na grupę. Celem jest wyprodukowanie odpowiedniej liczby ciąż i potomstwa w celu zapewnienia znaczącej oceny wpływu badanej substancji chemicznej na płodność, ciążę, zachowanie macierzyńskie i zwierząt ssących oraz wzrost i rozwój potomstwa F_1 w okresie od chwili poczęcia do 13 dnia po porodzie. Jeśli planuje się uśmiercanie w trakcie badania, liczbę należy zwiększyć o liczbę zwierząt przeznaczonych do uśmiercenia przed zakończeniem badań. Należy rozważyć włączenie dodatkowej satelitarnej grupy pięciu zwierząt obojga płci do grupy kontrolnej i grupy otrzymującej najwyższe dawki w celu obserwacji odwracalności, trwałości lub opóźnionego występowania skutków toksycznych przez co najmniej 14 dni po zakończeniu podawania substancji. Zwierzęta wchodzące w skład grup satelitarnych nie będą kryte, a zatem nie zostaną wykorzystane w ocenie toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej.

Dawkowanie

28. Zasadniczo należy wykorzystać co najmniej trzy grupy badane i jedną grupę kontrolną. Jeżeli nie ma dostępu do odpowiednich danych dotyczących ogólnej toksyczności, można wykonać badanie ustalające zakres (z wykorzystaniem zwierząt tego samego szczepu, pochodzących z tego samego źródła) w celu określenia dawek, które mają być zastosowane. Z wyjątkiem podawania badanej substancji chemicznej zwierzęta w grupie kontrolnej należy traktować w identyczny sposób jak zwierzęta w grupie badanej. Jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej jest stosowany nośnik, grupa kontrolna powinna otrzymać największą użytą objętość nośnika.

29. Poziomy dawki powinny być wybierane, biorąc pod uwagę jakiekolwiek istniejące dostępne dane o toksyczności i dane toksykokinetczne. Należy także wziąć pod uwagę, że mogą istnieć różnice w czułości między zwierzętami w ciąży a tymi niebędącymi w ciąży. Należy wybrać taki najwyższy poziom dawkowania, który powoduje oznaki toksyczności, ale nie zgon lub widoczne cierpienie. Następnie należy dobierać poziomy dawkowania w sekwencji malejącej w taki sposób, aby ukazać wszystkie reakcje powiązane z dawkowaniem i brak niekorzystnych zmian przy najmniejszym poziomie dawkowania. Często optymalne jest zastosowanie poziomów dawkowania różniących się od dwu- do czterokrotnie, a zamiast stosować bardzo odległe (np. różniące się więcej niż 10-krotnie) poziomy dawkowania, często lepiej jest dodać czwartą grupę badaną.

30. Jeśli obserwowana jest ogólna toksyczność (np. spadek masy ciała, wpływ na wątrobę, serce, płuca lub nerki itp.) bądź inne zmiany, które nie muszą być efektami toksycznymi (np. zmniejszone pobieranie pokarmu, powiększenie wątroby), należy zachować ostrożność interpretując obserwowane skutki w punktach końcowych wpływu na układ hormonalny.

Badanie graniczne

31. Jeżeli badanie z podawaniem doustnym przy jednym poziomie dawki równym co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała/dzień lub, w przypadku podawania w pożywieniu, równoważnej procentowej zawartości w pożywieniu lub wodzie pitnej (na podstawie ustalonej masy ciała), z zastosowaniem procedur opisanych dla tego badania, nie wywołuje widocznych efektów toksycznych i jeżeli nie należałoby spodziewać się toksyczności na podstawie danych dotyczących substancji strukturalnie pokrewnych,

▼M8

wówczas pełne badanie przy użyciu kilku poziomów dawki może nie być konieczne. Można zastosować badanie graniczne z wyjątkiem sytuacji, gdy narażenie ludzi wskazuje potrzebę zastosowania wyższego poziomu dawki. W odniesieniu do innych dróg podawania, na przykład wziewnej lub stosowania na skórę, fizyczne własności chemiczne badanych substancji chemicznych mogą często decydować o najwyższym możliwym do osiągnięcia narażeniu.

Podawanie dawek

32. Zwierzętom podaje się badaną substancję chemiczną codziennie, przez siedem dni w tygodniu. Gdy badana substancja chemiczna jest podawana przez sondę, należy ją podawać zwierzętom w pojedynczej dawce przy użyciu sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Maksymalna objętość płynu, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można użyć 2 ml/100 g masy ciała. Poza drażniącymi lub żrącymi badanymi substancjami chemicznymi, które zwykle dają zaostrzone objawy przy wyższych stężeniach, zmienność objętości w badaniu powinna być zminimalizowana przez dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość przy wszystkich poziomach dawki.

33. W przypadku substancji chemicznych podawanych w paszy lub w wodzie do picia należy dopilnować, aby ilości podawanej badanej substancji chemicznej nie zakłócały zwykłego odżywiania lub gospodarki wodnej organizmu. Przy podawaniu badanej substancji chemicznej wraz z pokarmem można zastosować stałe stężenie w pokarmie (ppm) lub też stały poziom dawki w zależności od masy ciała zwierzęcia; należy podać zastosowany wariant. W przypadku badanej substancji chemicznej podawanej przez sondę, dawka powinna być podawana każdego dnia o podobnej porze i w razie konieczności modyfikowana co najmniej raz na tydzień, aby utrzymać stały poziom dawki w zależności od masy ciała zwierzęcia. W przypadku wykorzystania badania łączonego jako badania wstępnego przed badaniem długoterminowym lub pełnym badaniem toksyczności reprodukcyjnej, należy w obu badaniach stosować podobną dietę.

Harmonogram doświadczalny

34. Podawanie dawek osobnikom obu płci należy rozpocząć co najmniej dwa tygodnie przed kryciem, co najmniej pięć dni po aklimatyzacji i po poddaniu samic badaniu przesiewowemu pod kątem normalnych cykli estrogenowych (przez dwa tygodnie przed okresem poddawania działaniu substancji). Badanie powinno być zaprogramowane w taki sposób, żeby ocena cyklu estrogenowego rozpoczynała się zaraz po osiągnięciu przez zwierzęta pełnej dojrzałości płciowej. Pod tym względem mogą występować nieznaczne różnice u różnych szczepów szczurów wykorzystywanych w różnych laboratoriach, np. szczury szczepu Sprague Dawley osiągają dojrzałość płciową po 10 tygodniach życia, a szczepu Wistar – po około 12 tygodniach. Matki posiadające potomstwo należy uśmiercić 13. dnia po porodzie lub wkrótce po tym dniu. Aby umożliwić wstrzymanie podawania zwierzętom pokarmu matkom przed pobraniem krwi (jeżeli preferuje się taki wariant), matki i ich potomstwo nie muszą być uśmiercone tego samego dnia. Dzień narodzin (tj. dzień zakończenia porodu) określa się jako dzień 0 po porodzie. Samice, u których nie zaobserwowano oznak kopulacji, uśmierca się po 24–26 dniach od ostatniego dnia okresu krycia. Dawkowanie należy kontynuować u obu płci przez okres krycia. Dawkowanie u samców należy nadal stosować po okresie krycia co najmniej do zakończenia minimalnego łącznego okresu dawkowania wynoszącego 28 dni. Następnie samce są uśmiercane lub ewentualnie zatrzymywane i kontynuuje się dawkowanie w celu ewentualnego drugiego krycia, jeśli uzna się to za stosowne.

35. Codziennie dawkowanie u rodzicielskich samic powinno dalej trwać przez cały okres ciąży, co najmniej do 13. dnia po porodzie włącznie, lub do dnia poprzedzającego uśmiercenie. W przypadku badań, w których badaną substancję chemiczną podaje się drogą wziewną lub skórną, dawkowanie powinno trwać co najmniej do 19. dnia ciąży włącznie i powinno zostać wznowione najszybciej jak to możliwe, nie później niż w czwartym dniu po urodzeniu.

▼M8

36. Jeżeli uwzględniono zwierzęta z grupy satelitarnej przeznaczone do obserwacji uzupełniających, nie wykorzystuje się ich do krycia. Należy je trzymać przez co najmniej 14 kolejnych dni po pierwszym planowanym uśmierceniu matek bez podawania substancji w celu wykrycia opóźnionego pojawienia się, utrzymywania lub ustąpienia efektów toksyczności.

37. Diagram przedstawiający harmonogram doświadczenia znajduje się w dodatku 2.

Cykle estrogenowe

38. Monitorowanie cykli estrogenowych powinno odbywać się przed rozpoczęciem poddawania działaniu substancji, aby do badania wybrać samice o regularnej cykliczności (zob. pkt 27). Należy także codziennie, od rozpoczęcia poddawania działaniu substancji do potwierdzenia krycia, monitorować rozmazy śluzówki pochwy. Jeżeli istnieje obawa o wystąpienie dotkliwych skutków stresu mogących zmienić cykle estrogenowe wraz z rozpoczęciem dawkowania, laboratoria mogą przez dwa tygodnie narażać zwierzęta doświadczalne, a następnie przez co najmniej dwa tygodnie codziennie pobierać rozmazy śluzówki pochwy, by monitorować cykl estrogenowy w okresie poprzedzającym krycie i ciągle monitorować go w okresie krycia, aż do momentu zaistnienia oznak krycia. Przy pozyskiwaniu komórek pochwy/szyjki macicy należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do uszkodzenia błony śluzowej, które mogłoby wywoływać ciążę rzekomą (8)(9).

Procedura krycia

39. Podczas tego badania należy zazwyczaj wykorzystywać krycia 1:1 (jeden samiec na jedną samicę). W przypadku wystąpienia sporadycznych zgonów samców mogą pojawić się wyjątki. Samicę należy umieścić razem z tym samym samcem na okres trwający do momentu odnotowania kopulacji lub dwa tygodnie. Każdego dnia rano samice należy poddać badaniu na obecność plemników lub czopa pochwowego. Dzień 0 ciąży określa się jako dzień, w którym potwierdzono wystąpienie krycia (wykrycie czopa pochwowego lub plemników). Jeśli kojarzenie w danej parze nie uda się, można rozważyć krycie samic samcami o dowiedzionej płodności.

Liczebność miotu

40. Czwartego dnia po porodzie można skorygować liczebność każdego miotu, eliminując dodatkowe, losowo wybrane młode w miocie, by otrzymać, na ile to możliwe, cztery lub pięć samic i cztery lub pięć samców na miot, w zależności od typowej liczebności miotów w szczepie wykorzystanych szczurów. Próbki krwi należy pobrać od dwóch młodych nieprzydzielonych do żadnej kohorty, zebrać je i wykorzystać do określenia poziomów surowicy T4. Selektywna eliminacja młodych, np. oparta na masie ciała lub odległości anogenitalnej, jest nieodpowiednia. Ilekroć liczba młodych samców lub samic uniemożliwia uzyskanie czterech lub pięciu osobników każdej płci na miot, dopuszczalne jest częściowe dostosowanie (na przykład sześć samców i cztery samice). Żadne młode nie zostanie wyeliminowane, gdy liczebność miotu spadnie poniżej celu eliminacji (8 lub 10 młodych/miot) Jeżeli dostępne jest tylko jedno młode powyżej celu eliminacji, tylko jedno młode zostanie wyeliminowane i wykorzystane do pobrania krwi do ewentualnej oceny surowicy T4.

41. Jeżeli liczebność miotu nie została skorygowana, dwa młode na miot uśmierca się 4. dnia po urodzeniu, a próbki krwi pobiera się do pomiaru stężeń hormonów tarczycy w surowicy. Jeżeli to możliwe, dwa młode na miot powinny stanowić młode samice, aby zachować młode samce na potrzeby ocen zatrzymywania płynu w brodawkach sutkowych, oprócz przypadku, w którym eliminacja tych młodych powoduje, że nie pozostaną żadne samice do oceny końcowej przy uśmiercaniu. Żadne młode nie zostanie wyeliminowane, gdy rozmiar miotu spadnie poniżej 8 lub 10 młodych/miot (w zależności od typowego rozmiaru miotu w szczepie wykorzystanych szczurów). Jeżeli dostępne jest tylko jedno młode powyżej typowej liczebności miotu, tylko jedno młode zostanie wyeliminowane i wykorzystane do pobrania krwi do ewentualnej oceny surowicy T4.

▼M8

Obserwacje

42. Ogólne obserwacje kliniczne powinny być przeprowadzane co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze, biorąc pod uwagę szczytowy okres przewidywanych objawów po dawkowaniu. Należy rejestrować stan zdrowia zwierząt. Co najmniej dwa razy dziennie wszystkie zwierzęta poddaje się obserwacjom pod kątem zachorowalności i śmiertelności.

43. Dla wszystkich rodzicielskich zwierząt należy przeprowadzać szczegółowe obserwacje kliniczne: jeden raz przed pierwszym narażeniem (w celu umożliwienia porównania badanych zwierząt), a następnie co najmniej raz w tygodniu. Obserwacji należy dokonywać poza klatką zwierzęcia, najlepiej w warunkach standardowych i każdego dnia o tej samej porze. Obserwacje należy starannie odnotowywać najlepiej za pomocą systemów punktacji wyraźnie określonych przez laboratorium badawcze. Należy dołożyć starań w celu dopilnowania, aby odchylenia w warunkach badania były minimalne, preferowane jest prowadzenie obserwacji przez osoby, które nie wiedzą, jaka substancja jest podawana. Odnotowane objawy powinny obejmować między innymi zmiany w skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin i wydalin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego (np. łzawienie, piloreksja, rozmiar źrenicy, zmieniony rytm oddychania). Należy odnotować także zmiany w sposobie chodzenia, postawie i reakcji na dotyk, jak również obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, zachowań stereotypowych (np. nadmierne czyszczenie się, powtarzające się krążenie w kółko), trudny lub długotrwały poród oraz dziwne zachowania (np. samookaleczanie się, chodzenie do tyłu) (10).

44. Raz w ciągu badania należy przeprowadzić ocenę reaktywności na bodźce różnego typu (np. słuchowe, wzrokowe i czucia głębokiego) (8)(9)(11), ocenę siły uchwytu (12) oraz ocenę aktywności motorycznej (13) na pięciu samcach i pięciu samicach losowo wybranych z każdej z grup. Dalsze szczegółowe informacje na temat procedur, jakie można zastosować, podano w odpowiednich odniesieniach. Można jednak także zastosować również procedury inne niż te podane w odniesieniach. W przypadku samców danych obserwacji funkcjonalnych należy dokonać pod koniec ich okresu dawkowania, krótko przed planowanym uśmierceniem ale przed pobieraniem próbek krwi do analizy pod kątem hematologii lub chemii klinicznej (zob. pkt 53–56, w tym przypis 1). W trakcie tych badań funkcjonalnych samice powinny być w fizjologicznie podobnym stanie i najlepiej badać je raz w trakcie ostatniego tygodnia laktacji (np. LD 6–13), na krótko przed planowanym uśmierceniem. W miarę możliwości należy zminimalizować czas, w którym matki i młode przebywają osobno.

45. Obserwacje funkcjonalne przeprowadzane tylko raz odnośnie do końca badań mogą być pominięte, gdy badanie prowadzone jest jako badanie wstępne do późniejszego badania podchronicznego (90-dniowego) lub badania długofalowego. W takim przypadku obserwacje funkcjonalne należy zamieścić w tym badaniu uzupełniającym. Z drugiej strony, dostępność danych dotyczących obserwacji czynnościowych z tego badania z powtarzanym dawkowaniem może zwiększyć możliwości doboru poziomów dawkowania do celów późniejszego badania toksyczności podprzewlekłej lub badania długofalowego.

46. Wyjątkowo można pominąć obserwacje czynnościowe również w odniesieniu do grup, które oprócz tego przejawiają oznaki toksyczności nasilone na tyle, że mogłyby znacznie zakłócić wykonanie badania funkcjonalnego.

47. Począwszy od dnia 0 ciąży należy odnotowywać i liczyć czas jej trwania. Każdy miot należy zbadać tak szybko po urodzeniu jak to możliwe, w celu ustalenia liczby i płci młodych, płodów urodzonych martwo, płodów urodzonych żywo, słabowitych młodych w miocie (młodych o znacznie mniejszych rozmiarach niż odpowiadające młode kontrolne) oraz obecności poważnych nieprawidłowości.

▼M8

48. Należy zliczyć i ustalić płeć żywych młodych, a mioty należy zważyć w ciągu 24 godzin od porodu (w dniu 0 lub 1. dnia po porodzie) oraz co najmniej 4. i 13. dnia po porodzie. W dodatku do obserwacji dotyczących zwierząt rodzicielskich (zob. pkt 43 i 44), należy odnotować wszelkie nieprawidłowe zachowania potomstwa.

49. Odległość anogenitalną każdego młodego należy mierzyć w tym samym dniu po urodzeniu – między 0. a 4. dniem po urodzeniu. W dniu pomiaru odległości anogenitalnej należy dokonać pomiaru masy ciała młodego, a odległość anogenitalną należy znormalizować w odniesieniu do pomiaru wielkości młodego, najlepiej jako pierwiastek kwadratowy masy ciała (14). Liczbę brodawek sutkowych / otoczek brodawek u młodych samców należy mierzyć, według zaleceń zawartych w wytycznej OECD nr 151, 12. lub 13. dnia po urodzeniu (15).

Masa ciała i spożycie pokarmu/wody

50. Samce i samice należy zważyć w pierwszym dniu dawkowania, a następnie co najmniej raz tygodniowo oraz w momencie zakończenia dawkowania. Samice w okresie ciąży należy ważyć w dniach 0, 7, 14 i 20 oraz w ciągu 24 godzin od porodu (w dniu 0 lub 1. dniu po porodzie), a także co najmniej 4. i 13. dnia po porodzie. Obserwacje te należy umieścić w sprawozdaniu oddzielnie w odniesieniu do każdego dorosłego zwierzęcia.

51. Przed kryciem, w okresie ciąży oraz laktacji spożycie pokarmu należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu. W okresie krycia pomiar spożycia pokarmu nie jest obowiązkowy. W tych okresach należy także mierzyć spożycie wody, jeżeli badana substancja chemiczna podawana jest za pośrednictwem tego nośnika.

Hematologia

52. W okresie badania na pięciu samcach i pięciu samicach losowo wybranych z każdej z grup należy jednorazowo przeprowadzić następujące analizy hematologiczne: hematokryt, stężenia hemoglobiny, liczba erytrocytów, liczba retikulocytów, całkowita i różnicowa liczba leukocytów, liczba płytek krwi i pomiar czasu krzepnięcia krwi. Jeśli badana substancja chemiczna lub jej potencjalne metabolity mają właściwości utleniające lub podejrzewa się, że mogą mieć takie właściwości, należy również przeprowadzić inne oznaczenia, w tym stężenia methemoglobiny i ciałek Heinza.

53. Próbki krwi należy pobierać z wyznaczonego miejsca. Podczas pobierania próbek samice powinny być w fizjologicznie podobnym stanie. Aby uniknąć utrudnień praktycznych związanych ze zmiennością na początku ciąży, pobrania próbek krwi samic można dokonać na końcu okresu poprzedzającego krycie, ponieważ jest to metoda alternatywna do pobierania próbek tuż przed, lub w ramach procedury eutanazji zwierząt. Najlepiej, by próbki krwi samców pobierać tuż przed eutanazją zwierząt lub jako element tej procedury. Ewentualnie pobieranie próbek krwi od samców można także przeprowadzić pod koniec okresu poprzedzającego krycie, w przypadku gdy ten punkt czasowy był preferowany u samic.

54. Próbki krwi należy przechowywać we właściwych warunkach.

Biochemia kliniczna

55. Oznaczenia biochemii klinicznej w celu zbadania głównych efektów toksycznych w tkankach, a w szczególności wpływu na nerki i wątrobę, powinny być wykonywane na próbkach krwi pobranych od wybranych pięciu samców i pięciu samic z każdej grupy. Zalecane jest

▼M8

wstrzymanie podawania pożywienia zwierzętom przez noc poprzedzającą pobranie krwi ([1]). Badania osocza i surowicy powinny obejmować sód, potas, glukozę, cholesterol całkowity, mocznik, kreatyninę, białko całkowite i albuminę, co najmniej dwa enzymy wskazujące na skutki komórkowe w wątrobie (takie jak aminotransferaza alaninowa, aminotransferaza asparaginowa i dehydrogenaza sorbitolu) oraz kwasy żółciowe. W pewnych okolicznościach przydatnych informacji mogą dostarczyć pomiary dodatkowych enzymów (pochodzenia wątrobowego lub innego) oraz bilirubiny.

56. Próbki krwi z określonego miejsca pobiera się według następującego planu:

— od co najmniej dwóch młodych na miot 4. dnia po urodzeniu, jeżeli liczba młodych na to pozwala (zob. pkt 40–41);

— od wszystkich matek oraz co najmniej dwóch młodych z każdego miotu przy zakończeniu badania 13. dnia; oraz

— od wszystkich dorosłych samców w dniu zakończenia badania.

Wszystkie próbki krwi przechowuje się w odpowiednich warunkach. Próbki krwi pobrane od 13-dniowych młodych oraz dorosłych samców ocenia się pod kątem poziomów surowicy hormonów tarczycy (T4). Jeżeli uzna się za stosowne, przeprowadzana jest dalsza ocena T4 w próbkach krwi od matek oraz 4-dniowych młodych. Jeżeli uzna się to za stosowne, można przeprowadzić opcjonalny pomiar innych hormonów. Krew młodych z każdego miotu można połączyć do celów analizy hormonów tarczycy. Hormony tarczycy (T4 i TSH) zaleca się mierzyć jako „całkowite”.

57. Fakultatywnie u pięciu przypadkowo wybranych samców w każdej grupie można przeprowadzić następujące oznaczenia analityczne w moczu w ciągu ostatniego tygodnia badań; przejrzystość, objętość, osmolalność lub ciężar właściwy, pH, białka, glukoza i komórki krwi.

58. Dodatkowo należy rozważyć zastosowanie do badań surowicy znaczników ogólnego uszkodzenia tkanek. Inne oznaczenia, które powinny być przeprowadzone, jeżeli znane właściwości badanej substancji chemicznej mogą lub podejrzewa się, że mogą wpływać na pokrewne profile metaboliczne, obejmują wapń, fosforan, triglicerydy i glukozę po poście, hormony specyficzne, metahemoglobinę i cholinoesterazę. Kwestie te należy identyfikować indywidualnie dla każdego przypadku.

59. Na zmienność i wartości bezwzględne stężeń przy oznaczaniu hormonów mogą mieć wpływ następujące czynniki:

— czas uśmiercenia zwierzęcia w związku z dobową zmiennością stężeń hormonów;

([1]) W odniesieniu do niektórych pomiarów dotyczących surowicy i osocza, w szczególności dla glukozy, zaleca się wstrzymanie podawania pokarmu przez noc. Zalecenie to wynika głównie z faktu, że zwiększona zmienność, którą nieuchronnie powoduje nieprzerwanie podawania pokarmu, często maskuje bardziej subtelne skutki, co utrudnia interpretację wyników. Z drugiej jednak strony, niekarmienie przez noc może zakłócać ogólny metabolizm zwierząt (w ciąży), zaburzać laktację i zachowanie podczas karmienia i, w szczególności w badaniach żywieniowych, może zakłócać dzienne narażenie na działanie badanej substancji chemicznej. Jeżeli przyjęto wstrzymanie podawania pożywienia przez całą noc, biochemiczne oznaczenia kliniczne należy wykonać po przeprowadzeniu obserwacji czynnościowych w 4. tygodniu badania samców. Matki należy przetrzymać przez dodatkowy dzień po usunięciu młodych 13. dnia po urodzeniu). Matki nie powinny otrzymywać pokarmu w nocy z 13 na 14. dzień laktacji i należy wykorzystać krew z dnia uśmiercenia do celów ustalenia parametrów chemii klinicznej.

▼M8

— metoda uśmiercenia zastosowana w celu uniknięcia zbędnego stresu dla zwierząt, mogącego wpłynąć na stężenia hormonów;

— zestawy do oznaczania hormonów, których krzywe standardowe mogą się różnić.

60. Próbki osocza przeznaczone konkretnie do oznaczenia poziomu hormonów należy pobierać w porównywalnej porze dnia. Wartości liczbowe uzyskane w toku analizy stężeń hormonów różnią się w zależności od zastosowanego dostępnego w handlu zestawu testowego.

61. Jeżeli historyczne dane odniesienia są niewystarczające, należy rozważyć oznaczenie zmiennych hematologicznych i biochemii klinicznej przed rozpoczęciem podawania dawek lub, lepiej, w grupie zwierząt niebędących zwierzętami doświadczalnymi. W przypadku samic dane muszą dotyczyć zwierząt w okresie laktacji.

PATOLOGIA

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

62. Wszystkie dorosłe zwierzęta w badaniu powinny podlegać szczegółowemu pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu, które obejmuje staranne badanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszystkich otworów ciała, jamy czaszkowej, klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Szczególną uwagę należy zwrócić na organy układu rozrodczego. Należy odnotować liczbę miejsc zagnieżdżenia. Rozmazy śluzówki pochwy należy zbadać w dniu autopsji, aby określić stadium cyklu estrogenowego oraz umożliwić korelację z histopatologią organów rozrodczych samicy.

63. Jądra i najądrza, a także gruczoł krokowy i kanaliki nasienne z całymi gruczołami koagulującymi wszystkich dorosłych samców należy, w stosownym przypadku, wyczyścić z wszelkich przylegających tkanek, a ich mokrą masę należy pobrać jak najszybciej po dysekcji, aby zapobiec jej wyschnięciu. Ponadto opcjonalne masy narządów mogą w przypadku samców obejmować zespół mięśni dźwigacza odbytu i mięśni opuszkowo-jamistych, gruczoły Cowpera i żołądź, a w przypadku samic parę jajników (mokra masa) i macicę (wraz z szyjką); jeżeli są uwzględnione, masy te należy określić jak najszybciej po dysekcji. Należy zachować jajniki, jądra, najądrza, płciowe narządy dodatkowe i jakiekolwiek narządy wykazujące makroskopowe zmiany patologiczne wszystkich dorosłych zwierząt.

64. Gruczoły tarczowe wszystkich dorosłych samców i samic oraz jednego młodego, 13-dniowego samca i samicy powinny być zakonserwowane w najwłaściwszym środku utrwalającym dla zamierzonych kolejnych badań histopatologicznych. Masę tarczycy można określić po utrwaleniu. Należy zachować dużą ostrożność przy okrawaniu i wykonywać je dopiero po utrwaleniu, w celu uniknięcia uszkodzenia tkanek. Mogłoby ono zakłócić analizę histopatologiczną. Próbki krwi należy pobierać z wyznaczonego miejsca tuż przed eutanazją zwierząt lub jako element jej procedury i przechowywać w odpowiednich warunkach (zob. pkt 56).

▼M8

65. Ponadto wątroby, nerki, nadnercza, grasice, śledziony, mózgi i serca co najmniej pięciu dorosłych, losowo wybranych z każdej grupy samców i samic (poza tymi, które znaleziono w agonii lub poddano eutanazji przed zakończeniem badania) należy wyczyścić z wszelkich przylegających tkanek, a ich mokrą masę, aby uniknąć wyschnięcia, należy pobrać możliwie najszybciej po dysekcji. Następujące tkanki powinny być zakonserwowane w najwłaściwszym środku utrwalającym dla obu typów tkanek i zamierzonych kolejnych badań histopatologicznych: wszystkie poważne zmiany patologiczne, mózg (reprezentatywne obszary, w tym kresomózgowie, móżdżek i most), rdzeń kręgowy, oko, żołądek, jelito cienkie i grube (w tym kępki Peyera), wątrobę, nerki, nadnercza, śledzionę, serce, grasicę, tchawicę i płuca (zakonserwowane przez napełnienie środkiem utrwalającym i następnie zanurzenie), gonady (jądra i jajniki), płciowe narządy dodatkowe (macicę i szyjkę macicy, najądrza, prostatę, pęcherzyki nasienne wraz z gruczołami koagulującymi), pochwę, pęcherz moczowy, węzły chłonne (poza najbliższym węzłem chłonnym należy pobrać inny węzeł w zależności od doświadczenia laboratorium (16)), nerw obwodowy (kulszowy lub piszczelowy), najlepiej w bliskiej odległości od mięśnia, mięsień szkieletowy i kość szkieletową wraz ze szpikiem kostnym (wycinek lub ewentualnie świeżo pobrany szpik kostny). Zaleca się utrwalenie jąder poprzez zanurzenie w utrwalaczu Bouina lub zmodyfikowanym utrwalaczu Davidsona (16)(17)(18); nie zaleca się utrwalania tych tkanek w formalinie. Błonę białawą trzeba delikatnie i płytko przekłuć igłą na obu biegunach narządu w celu umożliwienia szybkiego wniknięcia płynu utrwalającego. Wyniki badań klinicznych i inne ustalenia mogą wskazać na konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Organy uznane za prawdopodobne organy docelowe, w oparciu o znane właściwości substancji badanej, także należy zachować.

66. Ważnych wskazówek co do efektów związanych z układem hormonalnym mogą dostarczyć badania następujących tkanek: gonad (jajników i jąder), płciowych narządów dodatkowych (macicy wraz z szyjką, najądrzy, pęcherzyków nasiennych z gruczołami koagulacyjnymi, części grzbietowo-bocznej i brzusznej prostaty), pochwy, przysadki mózgowej, męskich gruczołów mlekowych i gruczołu nadnerczowego. Zmiany w męskich gruczołach mlekowych nie są zbyt dobrze udokumentowane, ale parametr ten może być bardzo czuły na substancje o działaniu estrogenowym. Obserwacja organów/tkanek niewykazanych w pkt 65 jest opcjonalna.

67. Martwe młode i młode zabite 13. dnia po porodzie lub wkrótce potem należy co najmniej przebadać zewnętrznie z zachowaniem ostrożności pod kątem poważnych nieprawidłowości. Szczególną uwagę należy zwrócić na zewnętrzne narządy rozrodcze, które należy zbadać pod kątem zmian rozwojowych.

Histopatologia

68. Należy wykonać szczegółową histopatologię zachowanych organów i tkanek zwierząt wytypowanych w grupach kontrolnych i grupach otrzymujących wysoką dawkę (ze szczególnym naciskiem na stadia spermatogenezy w gonadach samców i histopatologię śródmiąższowej struktury komórek jąder). Gruczoły tarczowe pochodzące od młodych i pozostałych dorosłych zwierząt w razie potrzeby mogą być badane. Badania te powinny być rozciągnięte na inne grupy badane, jeśli w grupie otrzymującej najwyższe dawki obserwuje się zmiany związane z działaniem substancji. W wytycznych dotyczących histopatologii (10) podano dodatkowe informacje dotyczące wycinania, utrwalania, dzielenia i histopatologii tkanek układu hormonalnego.

69. Należy przebadać wszystkie uszkodzenia. Aby ułatwić objaśnienie poziomów dawkowania, przy których nie obserwuje się szkodliwych zmian, należy zbadać organy docelowe w innych grupach otrzymujących dawkę, a w szczególności w grupach, które te poziomy rzekomo wykazują.

▼M8

70. Jeśli wykorzystuje się grupę satelitarną, należy przeprowadzić badanie histopatologiczne tych tkanek i organów, w których – w grupach otrzymujących substancję badaną – stwierdzono skutki podania substancji.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

71. Należy podać dane każdego zwierzęcia. Ponadto wszystkie dane należy podsumować w formie tabeli wykazującej, w odniesieniu do każdej grupy badanej i każdego pokolenia, liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które znaleziono martwe podczas badania lub zwierząt uśmierconych ze względów humanitarnych, czas śmierci lub uśmiercenia, liczbę zwierząt płodnych, liczbę ciężarnych samic, liczbę zwierząt wykazujących zaobserwowane oznaki toksyczności, z podaniem czasu ich pojawienia się, w tym czasu trwania, ciężkości wszelkich skutków toksyczności, rodzajów zmian histopatologicznych oraz wszelkich odnośnych danych miotów. W dodatku 3 przedstawiono podsumowanie w formie tabeli, które okazało się być bardzo przydatne przy ocenianiu efektów reprodukcyjnych/rozwojowych.

72. O ile to możliwe, wyniki liczbowe należy poddawać ocenie za pomocą właściwych i ogólnie przyjętych metod statystycznych. Przy porównywaniu skutków dla różnych dawek należy unikać stosowania wielokrotnego porównywania testem t-Studenta. Metody statystyczne należy wybrać podczas planowania badania. Analiza statystyczna odległości anogenitalnej i zatrzymywania płynu w brodawkach powinna być oparta na danych dotyczących poszczególnych młodych z uwzględnieniem wpływu na miot. W stosownych przypadkach za jednostkę analityczną uznaje się miot. Analiza statystyczna masy ciała młodych powinna być oparta na danych dotyczących poszczególnych młodych z uwzględnieniem liczebności miotu. Ze względu na ograniczone wymiary badania, analizy statystyczne w postaci testów na „istotność” mają ograniczoną wartość dla wielu punktów końcowych, zwłaszcza reprodukcyjnych punktów końcowych. Niewłaściwe są niektóre z najszerzej stosowanych metod, zwłaszcza badania parametryczne dotyczące średnich. Jeżeli wykorzystywane są analizy statystyczne, wybrana metoda powinna być odpowiednia dla rozkładu badanej zmiennej i powinna być wybrana przed rozpoczęciem badania.

Ocena wyników

73. Wyniki tego badania toksyczności powinny być oceniane w kategoriach zaobserwowanych skutków, wyników autopsji i badań mikroskopowych. Ocena obejmuje zależność pomiędzy dawką badanej substancji chemicznej a obecnością lub brakiem, częstością i ciężkością nieprawidłowości, w tym poważnych zmian patologicznych, wskazanymi organami docelowymi, bezpłodnością, nieprawidłowościami klinicznymi, zmienionymi funkcjami rozrodczymi i funkcjonowaniem miotów, zmianami masy ciała, wpływem na śmiertelność i wszelkimi innymi skutkami toksycznymi.

74. Ze względu na krótki okres poddania działaniu substancji w odniesieniu do samców, przy ocenie wpływu na rozrodczość u samców należy uwzględnić histopatologię jąder i najądrzy oraz dane dotyczące płodności. Wykorzystanie historycznych danych dotyczących kontroli odnoszących się do reprodukcji/rozwoju (np. dotyczących wielkości miotu, odległości anogenitalnej, zatrzymywania płynu w brodawkach, poziomu T4 w surowicy), w przypadku gdy są one dostępne, może być również przydatne jako pomoc w interpretacji badania.

75. Proponuje się, aby do celów kontroli jakości zbierać historyczne dane kontrolne i obliczać współczynniki zmienności dla danych liczbowych, szczególnie w odniesieniu do parametrów związanych z wykrywaniem substancji zakłócających funkcjonowanie układu hormonalnego. Dane te można wykorzystać do celów porównawczych przy ocenie bieżących badań.

▼M8

Sprawozdanie z badania

76. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli są znane;

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana.

substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Nośnik (w stosownych przypadkach):

— uzasadnienie wyboru nośnika, jeśli jest inny niż woda.

Zwierzęta doświadczalne:

— wykorzystany gatunek/szczep;

— liczba, wiek i płeć zwierząt;

— źródło pochodzenia, warunki utrzymywania, pasza itp.;

— masa ciała poszczególnych zwierząt na początku badania;

— uzasadnienie wyboru gatunku, jeśli jest inny niż szczur.

Warunki badania:

— uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania;

— szczegóły dotyczące przygotowania formy użytkowej badanej substancji chemicznej / przygotowania paszy, uzyskanego stężenia, trwałości i jednorodności preparatu,

— szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej;

— wskaźnik konwersji stężenia badanej substancji chemicznej w pokarmie / wodzie pitnej (ppm) do dawki rzeczywistej (mg/kg masy ciała/dzień), jeśli ma to zastosowanie;

— szczegółowe informacje dotyczące jakości pokarmu i wody;

— szczegółowy opis procedury randomizacji stosowanej do doboru młodych do eliminacji w przypadku, gdy się jej dokonuje.

Wyniki:

— masa ciała / zmiany masy ciała,

— dane dotyczące spożycia pokarmu oraz wody, w stosownych przypadkach;

▼**M8**

— dane dotyczące efektu toksycznego ze względu na płeć i dawkę, włączając płodność, ciążę i wszelkie inne objawy

— toksyczności;

— długość trwania ciąży; wpływ toksyczności lub innych skutków na reprodukcję, potomstwo i rozwój poporodowy itp.;

— rodzaj, nasilenie i czas trwania obserwowanych objawów klinicznych (tak odwracalnych, jak i nieodwracalnych);

— oceny aktywności sensorycznej, siły uchwytu i aktywności motorycznej;

— badania hematologiczne wraz z odpowiednimi wartościami odniesienia;

— badania biochemii klinicznej wraz z odpowiednimi wartościami odniesienia;

— liczba dorosłych samic, u których występuje normalny lub nienormalny cykl estrogenowy i czas trwania cyklu;

— liczba młodych urodzonych żywo i strat poimplantacyjnych;

— liczba młodych z wyraźnie widocznymi nieprawidłowościami; ocena wzrokowa zewnętrznych narządów płciowych, liczba słabowitych młodych w miocie;

— czas zgonu podczas badania lub informacja o tym, czy zwierzęta przetrwały do czasu zakończenia badania;

— liczba zagnieżdżeń, liczebność miotu i masa poszczególnych młodych w miocie w momencie rejestracji;

— dane dotyczące masy ciała młodego;

— odległość anogenitalna u wszystkich młodych (oraz masa ciała na dzień pomiaru odległości anogenitalnej);

— zatrzymywanie płynu w brodawkach u młodych płci męskiej;

— poziom hormonów tarczycy, młode w 13. dniu życia i dorosłe samce (oraz matki i młode w 4. dniu życia, jeśli dokonano pomiaru)

— masa ciała w chwili uśmiercenia oraz masa narządów u zwierząt rodzicielskich;

— wyniki autopsji;

— szczegółowy opis wyników badania histopatologicznego;

— dane dotyczące absorpcji (jeżeli są dostępne);

— w stosownych przypadkach statystyczne opracowanie wyników.

Omówienie wyników.

Wnioski

▼M8

Interpretacja wyników

77. Badanie dostarczy ocen toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej związanej z zastosowaniem powtarzanego dawkowania. W szczególności, ponieważ szczególną uwagę przywiązuje się do punktów końcowych toksyczności ogólnej i toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, wyniki badania pozwolą na odróżnienie skutków reprodukcyjnych/rozwojowych występujących przy braku ogólnej toksyczności od występujących jedynie na poziomach, które są toksyczne również dla zwierząt rodzicielskich (zob. pkt 7–11). Może ono stanowić wskazówkę co do potrzeby prowadzenia dalszych badań i może dostarczyć wytycznych przy opracowywaniu kolejnych badań. Przy interpretowaniu wyników dotyczących rozrodczości i rozwoju pomocny może być dokument zawierający wytyczne OECD nr 43 (19). Wytyczne OECD nr 106 w sprawie oceny histologicznej badań endokrynologicznych i reprodukcyjnych u gryzoni (OECD Guidance Document 106 on Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents) (16) zawierają informacje na temat przygotowania i oceny narządów (endokrynologicznych) i rozmazów śluzówki pochwy, które mogą być pomocne w niniejszej metodzie badawczej.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Dokument dostępny na wniosek w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju w Paryżu.

(2) OECD (1992). *Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods*, Tokio, 27–29 października 1992. Dokument dostępny na wniosek w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju w Paryżu.

(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. i 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." nr 19, s. 141–149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. i Tobe M. (1992). *Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide.* „Fundamental and Applied Toxicol." nr 18, s. 89–95.

(5) OECD (1998). *Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force*, Dokument dostępny na wniosek w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju w Paryżu, 10–11 marca 1998.

(6) OECD (2015). *Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints*. [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 217). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(7) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations*, [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 19. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

▼**M8**

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. i Cooper R.L. (2007). *The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies*, „Birth Defects Research" część B, nr 80 (2), 84–97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). *Cycles and Seasons*, w: C.R. Auston i R.V. Short, (red.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*. Cambridge, Nowy Jork.

(10) IPCS (1986). *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, [W:] Environmental Health Criteria Document nr 60.

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. i Phillips P.M. (1991). *Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz*, „Toxicol. AppliedPharmacol." nr 108, s. 267–283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. i Riley M.T. (1979). *A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice*, „Neurobehav. Toxicol." nr 1, s. 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." nr 13, s. 599–609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp i V.L. Reynolds. (1999). *Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights*, „Reproductive Toxicology" nr 13, s. 383–390.

(15) OECD (2013). *Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study,* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 151. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(16) OECD (2009) *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents*, [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 106. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(17) Hess RA i Moore BJ. (1993). *Histological Methods for the Evaluation of the Testis* [W:] „Methods in Reproductive Toxicology", R.E. Chapin i J.J. Heindel (red.), Academic Press: San Diego, Kalifornia, s. 52–85.

(18) J.R. Latendresse, A.R. Warbrittion, H. Jonassen, D.M. Creasy (2002). *Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid*, „Toxicol. Pathol." nr 30, s. 524–533.

(19) OECD (2008). *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*. [W:] Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 43). Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(20) OECD (2011), *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption* nr 150, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

▼**M8**

Dodatek 1

DEFINICJE (ZOB. RÓWNIEŻ WYTYCZNA OECD NR 150 (20))

Działanie androgenowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu androgenowego (np. testosteronu) w organizmach ssaków.

Działanie antyandrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu androgenowego (np. testosteronu) w organizmach ssaków.

Działanie antyestrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu estrogenowego (np. 17ß-estradiolu) w organizmach ssaków.

Działanie antytyroidowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu tarczycy (np. T_3) w organizmach ssaków.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Toksyczność rozwojowa objawy toksyczności reprodukcyjnej, reprezentującej zaburzenia przedporodowe, okołoporodowe, poporodowe, strukturalne lub czynnościowe u potomstwa.

Dawka jest to ilość podawanej badanej substancji chemicznej. Dawkę wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej na jednostkę masy ciała zwierzęcia doświadczalnego na dzień (np. mg/kg masy ciała/dzień) lub jako stałe stężenie w diecie.

Dawkowanie jest terminem ogólnym obejmującym dawkę, częstotliwość i czas trwania dawkowania.

Wyraźna toksyczność jest to określenie ogólne opisujące wyraźne oznaki toksyczności występujące po podaniu badanej substancji chemicznej. Powinny one być wystarczające do oceny ryzyka i mieć taki charakter, że można oczekiwać, iż zwiększenie podawanej dawki spowoduje pojawienie się silnych oznak toksyczności i prawdopodobną śmiertelność.

Upośledzenie płodności oznacza zaburzenie funkcji reprodukcyjnych lub zdolności reprodukcyjnych samców lub samic.

Toksyczność matczyna niekorzystny skutek dla ciężarnych samic, występujący swoiście (skutek bezpośredni) lub nieswoiście (skutek pośredni) i związany ze stanem ciężarnym.

NOAEL jest to skrót oznaczający poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian. Jest to najwyższy poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych efektów związanych z podawaniem substancji na skutek jej podawania.

Działanie estrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu estrogenowego (np. 17ß-estradiolu) w organizmach ssaków.

Toksyczność reprodukcyjna oznacza szkodliwy wpływ na potomstwo lub upośledzenie funkcji lub zdolności reprodukcyjnych u samców i samic.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

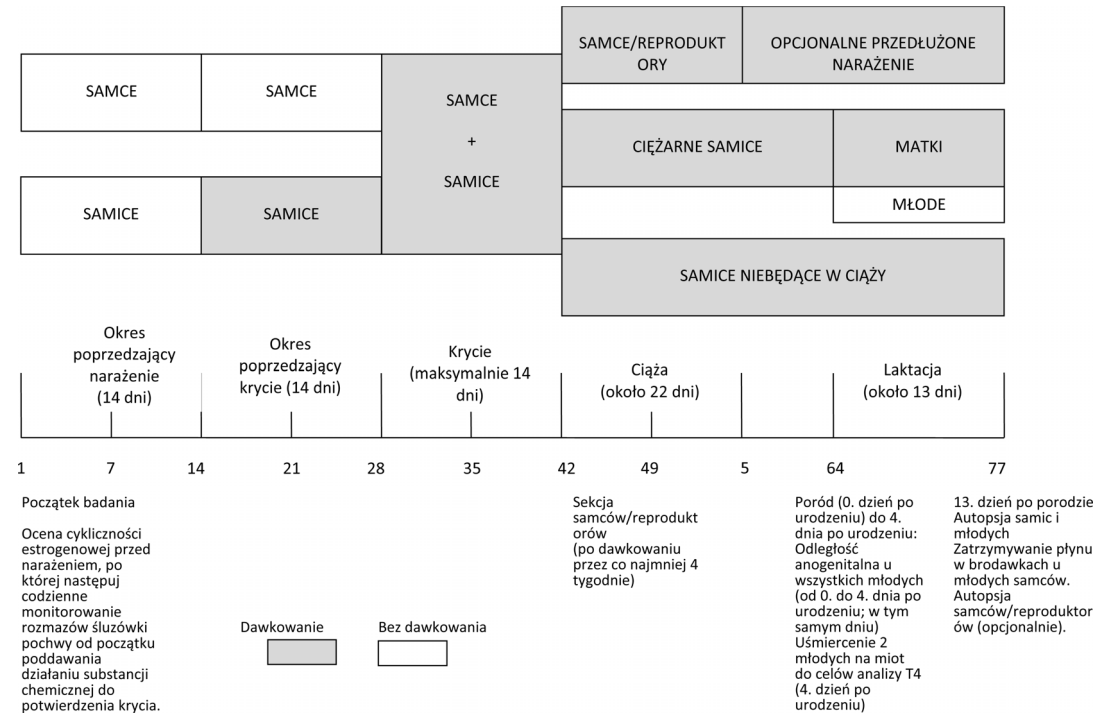
Działanie tyroidowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu tarczycy (np. T_3) w organizmach ssaków.

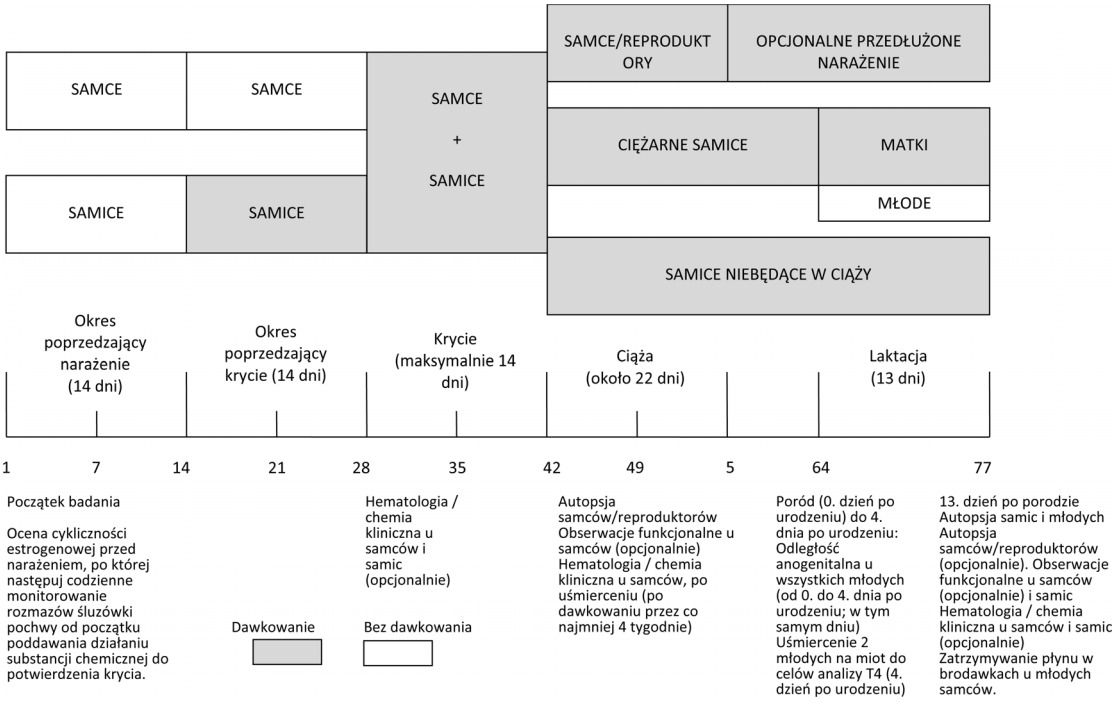
Walidacja jest to proces naukowy mający na celu scharakteryzowanie wymogów operacyjnych i ograniczeń metody badawczej i wykazanie jej wiarygodności oraz odpowiedniości do danego celu.

▼**M8**

Dodatek 2

SCHEMAT HARMONOGRAMU DOŚWIADCZALNEGO WSKAZUJĄCY MAKSYMALNY CZAS TRWANIA BADANIA, OPARTY NA PEŁNYM 14-DNIOWYM OKRESIE KRYCIA





▼**M8**

Dodatek 3

TABELARYCZNE SPRAWOZDANIE PODSUMOWUJĄCE WPŁYW NA REPRODUKCJĘ/ROZWÓJ

OBSERWACJE	WARTOŚCI				
Dawkowanie (jednostki)	0 (kontrola)	…	…	…	…
Zapoczątkowane pary (N)					
Cykl estrogenowy (co najmniej średnia długość i częstość występowania nieregularnych cykli)					
Samice wykazujące oznaki kopulacji (N)					
Samice zachodzące w ciążę (N)					
Dni poczęcia 1–5 (N)					
Dni poczęcia 6–… ([1]) (N)					
Ciąża ≤ 21 dni (N)					
Ciąża = 22 dni (N)					
Ciąża ≥ 23 dni (N)					
Matki z urodzonymi żywymi młodymi (N)					
Matki z żywymi młodymi w 4. dniu po porodzie (N)					
Implanty/matka (średnia)					
Żywe młode/matka przy porodzie (średnia)					
Żywe młode/matka w 4. dniu (średnia)					
Proporcja płci (samiec/samica) przy porodzie (średnia)					
Proporcja płci (samiec/samica) w 4 dniu (średnia)					
Masa miotu przy porodzie (średnia)					
Masa miotu w 4 dniu (średnia)					
Masa ciała młodego przy porodzie (średnia)					
Masa ciała młodego przy pomiarze odległości anogenitalnej (średnia dla samców, średnia dla samic)					
Odległość anogenitalna młodego w tym samym dniu po urodzeniu, urodzenie – 4. dzień (średnia dla samców, średnia dla samic, zaznaczyć dzień po urodzeniu)					
Masa ciała młodego w 4. dniu (średnia)					
Masa ciała młodego w 13. dniu (średnia)					

▼M8

OBSERWACJE	WARTOŚCI				
Zatrzymywanie płynu w brodawkach u młodych płci męskiej w 13 dniu (średnia)					
MŁODE Z ZABURZENIAMI					
Matki z 0					
Matki z 1					
Matki z ≥ 2					
UTRATA POTOMSTWA					
Przed urodzeniem (implantacje minus żywe urodzenia)					
Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice z ≥ 3					
Pourodzeniu (żywe urodzenia minus żywe 13. dnia po urodzeniu)					
Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice z ≥ 3					

([1]) ostatni dzień okresu krycia

▼M8

B.65 METODA BADAWCZA BARIERY MEMBRANOWEJ *IN VITRO* W PRZYPADKU DZIAŁANIA ŻRĄCEGO NA SKÓRĘ

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 435 (2015). Działanie żrące na skórę oznacza powstawanie nieodwracalnych uszkodzeń skóry, które przejawiają się jako widoczna martwica naskórka i skóry właściwej, w wyniku kontaktu z badaną substancję chemiczną zgodnie z definicją Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ) (1) i z rozporządzeniem Unii Europejskiej (UE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP) ([1]). Niniejsza metoda badawcza, równoważna zaktualizowanej metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 435 zapewnia metodę badawczą bariery membranowej *in vitro*, którą można zastosować, aby zidentyfikować żrące substancje chemiczne. W ramach metody badawczej wykorzystuje się sztuczną membranę zaprojektowaną, aby reagowała na żrące substancje chemiczne w sposób podobny do skóry zwierząt *in situ*.

2. Tradycyjnie ocenę działania żrącego na skórę przeprowadzano, nakładając badaną substancję chemiczną na skórę żywych zwierząt i oceniając stopień uszkodzenia tanki po upłynięciu ustalonego okresu (2). Oprócz obecnie stosowanej metody, jako metody alternatywne dla standardowej procedury *in vivo* dotyczącej skóry królików (rozdział B.4 niniejszego załącznika, równoważnej metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 404) stosowanej do identyfikowania żrących substancji chemicznych (2) przyjęto szereg innych metod badawczych *in vitro* (3)(4). W ramach zintegrowanej strategii GHS ONZ dotyczącej badania i analizowania w zakresie oceny i klasyfikacji działania żrącego na skórę oraz wytycznych OECD w sprawie zintegrowanego podejścia do badań i oceny (IATA) podrażnienia skóry / działania żrącego na skórę zaleca się stosowanie zweryfikowanych i zaakceptowanych metod badawczych *in vitro* w ramach modułu 3 i 4 (1)(5). W ramach IATA opisano szereg modułów grupujących źródła informacji i narzędzia służące do analizy oraz (i) przedstawiono wytyczne dotyczące sposobu integracji i wykorzystania istniejących danych pochodzących z badań i metod niebadawczych do oceny potencjałów substancji chemicznych do podrażnienia i działania żrącego na skórę, a także (ii) zaproponowano podejście, w przypadku gdy potrzebne są dalsze badania, w tym jeśli stwierdzono wyniki ujemne (5). W ramach tego podejścia modułowego można wykorzystać wyniki dodatnie z metod badawczych *in vitro*, aby zaklasyfikować substancję chemiczną jako żrącą bez konieczności przeprowadzania badań na zwierzętach, tym samym ograniczając i doskonaląc wykorzystanie zwierząt oraz zapobiegając bólowi i stresowi, który mógłby wystąpić, jeśli wykorzystywano by zwierzęta w tym celu.

3. Zakończono badania walidacyjne dotyczące modelu bariery membranowej *in vitro* dostępne na rynku jako Corrositex® (6)(7)(8), wykazując ogólną dokładność w przewidywaniu działania żrącego na skórę wynoszącą 79 % (128/163), wrażliwości – 85 % (76/89) i specyficzności – 70 % (52/74) w odniesieniu do bazy danych składającej się ze 163 substancji i mieszanin (7). Na podstawie jej potwierdzonej zasadności tę zwalidowaną metodę referencyjną (VRM) zalecono w celu zastosowania jako część zintegrowanej strategii badań dotyczącej oceniania potencjału substancji chemicznych w zakresie zagrożenia działaniem żrącym na skórę (5)(7). Zanim będzie można wykorzystać do celów regulacyjnych model bariery membranowej *in vitro* w przypadku działania żrącego na skórę, należy określić jej wiarygodność, przydatność (dokładność) oraz ograniczenia dotyczące jej proponowanego wykorzystania, aby zapewnić jej podobieństwo do VRM (9) zgodnie z wcześniej określonymi standardami wykonywania badań (PS) (10). Wzajemne uznawanie danych OECD będzie zagwarantowane wyłącznie po poddaniu przeglądowi każdej nowej lub zaktualizowanej metody zgodnej ze

([1]) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

▼M8

standardem wykonywania badań i włączeniu jej do równoważnych wytycznych OECD dotyczących badań. Obecnie wytyczne OECD dotyczące badań nr 435 obejmują wyłącznie jedną metodę *in vitro* i niniejszą metodę badawczą, dostępny na rynku model Corrositex®.

4. Inne metody badawcze dotyczące badania działania żrącego na skórę opierają się na wykorzystaniu zregenerowanej ludzkiej skóry (wytyczne OECD dotyczące badań nr 431) (3) oraz wyizolowanej skóry szczura (wytyczne OECD dotyczące badań nr 430) (4). Te wytyczne dotyczące badań przewidują również podzielenie żrących substancji chemicznych na trzy podkategorie GHS ONZ w odniesieniu do działania żrącego oraz trzy grupy opakowaniowe ONZ w celu transportu w związku z zagrożeniem działaniem żrącym. Te wytyczne dotyczące badań przyjęto pierwotnie w 2006 r. i zaktualizowano w 2015 r., aby odnieść się do wytycznych IATA i zaktualizować wykaz substancji służących do wykazania biegłości.

DEFINICJE

5. Stosowane definicje znajdują się w dodatku.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

6. Badanie opisane w niniejszej metodzie badawczej umożliwia zidentyfikowanie żrących badanych substancji chemicznych oraz pozwala na podzielenie żrących badanych substancji chemicznych na podkategorie zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP (tabela 1). Ponadto taką metodę badawczą można wykorzystać, aby podjąć decyzje dotyczące działania żrącego i braku działania żrącego szczególnych klas substancji chemicznych, np. kwasów organicznych i nieorganicznych, pochodnych kwasów ([1]) oraz podstaw określonych celów badania transportu (7)(11)(12). Niniejsza metoda badawcza opisuje ogólną procedurę podobną do zwalidowanej referencyjnej metody badawczej (7). Chociaż niniejsza metoda badawcza nie dostarcza wystarczających informacji na temat podrażnienia skóry, należy zauważyć, że metoda badawcza B.46 (równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 439) dotyczy konkretnie badania *in vitro*, powodującego skutki dla zdrowia w postaci podrażnienia skóry (13). Aby dokonać pełnej oceny miejscowego działania na skórę po pojedynczym narażeniu przez skórę, należy zapoznać się z wytycznymi OECD dotyczącymi zintegrowanych podejść do badań i oceny (5).

Tabela 1

Kategoria i podkategorie działania żrącego na skórę GHS ONZ ([1])

Kategoria działania żrącego (kategoria 1) (dla organów niestosujących podkategorii)	Podkategorie potencjalnego działania żrącego ([1]) (dla organów stosujących podkategorie, w tym rozporządzenie CLP)	Działanie żrące w przypadku ≥ 1 z 3 zwierząt	
		Narażanie	Uwagi
Żrące	Działanie żrące podkategorii 1A	≤ 3 minuty	≤ 1 godzina
	Działanie żrące podkategorii 1B	> 3 minuty / ≤ 1 godzina	≤ 14 dni
	Działanie żrące podkategorii 1C	> 1 godzina / ≤ 4 godziny	≤ 14 dni

([1]) Jeżeli chodzi o UE, w rozporządzeniu CLP wprowadzono trzy podkategorie działania żrącego na skórę – 1A, 1B i 1C.

7. Ograniczenie zwalidowanej metody referencyjnej (7) polega na możliwości niezakwalifikowania do badania wielu nieżrących substancji chemicznych i niektórych żrących substancji chemicznych na podstawie wyników wstępnego badania zgodności (zob. pkt 13). Uwodnione substancje chemiczne

([1]) „Pochodna kwasu” to niespecyficzna nazwa klasy szeroko zdefiniowana jako substancja chemiczna wytworzona bezpośrednio z kwasu albo poprzez modyfikację, albo częściową substytucję. Do tej klasy należą bezwodniki, kwasy halogenowe, sole i inne rodzaje substancji chemicznych.

▼M8

o pH mieszącym się w zakresie 4,5–8,5 często nie kwalifikują się do objęcia badaniem; jednak podczas badań na zwierzętach okazało się, że 85 % zbadanych substancji chemicznych o pH mieszczącym się w tym zakresie nie ma właściwości żrących (7). Metodę badawczą bariery membranowej *in vitro* można stosować w celu zbadania substancji stałych (rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych w wodzie), cieczy (wodnych lub niewodnych) i emulsji. Badanych substancji chemicznych niepowodujących wykrywalnej zmiany w badaniu zgodności (tj. zmiana barwy w systemie wykrywania substancji chemicznych zwalidowanej referencyjnej metody badawczej) nie można poddać badaniu metodą bariery membranowej, ale należy je badać przy użyciu innych metod badawczych.

ZASADA BADANIA

8. Układ badawczy składa się z dwóch elementów: syntetycznej makrocząsteczkowej bariery biologicznej i systemu wykrywania substancji chemicznych; niniejsza metoda badawcza pozwala wykrywać za pośrednictwem systemu wykrywania substancji chemicznych uszkodzenie bariery membranowej spowodowane przez badane żrące substancje chemiczne w następstwie zastosowania badanej substancji chemicznej na powierzchni syntetycznej makrocząsteczkowej bariery membranowej (7), przypuszczalnie na podstawie takiego samego mechanizmu lub takich samych mechanizmów działania żrącego na żywą skórę.

9. Penetrację bariery membranowej (lub jej przebicie) można zmierzyć wykorzystując w tym celu szereg procedur lub systemów wykrywania substancji chemicznych, w tym zmiany barwy barwnika we wskaźniku pH lub innej właściwości roztworu wskaźnika umieszczonego pod barierą.

10. Należy stwierdzić, czy bariera membranowa jest ważna, tj. właściwa i wiarygodna pod względem zamierzonego zastosowania. Działanie to obejmuje zapewnienie, by poszczególne preparaty były spójne pod względem właściwości bariery, np. zdolności do zachowania bariery w przypadku nieżrących substancji chemicznych, zdolności do kategoryzacji właściwości żrących substancji chemicznych w poszczególnych podkategoriach działania żrącego GHS ONZ (1). Przypisana klasyfikacja opiera się na czasie potrzebnym, aby substancja chemiczna przeniknęła przez barierę membranową do roztworu wskaźnika.

WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

11. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania metody badawczej bariery membranowej *in vitro* zgodnej z niniejszą metodą badawczą laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo klasyfikując 12 substancji służących do wykazania biegłości, które przedstawiono w tabeli 2. W przypadku gdy wykazana substancja nie jest dostępna lub gdy jest to uzasadnione, można użyć innej substancji, w odniesieniu do której dostępne są odpowiednie dane porównawcze z badań *in vivo* i *in vitro* (np. z wykazu referencyjnych substancji chemicznych (10)), pod warunkiem zastosowania tych samych kryteriów wyboru, które opisano w tabeli 1.

Tabela 2

Substancje służące do wykazania biegłości [1]

Substancja [2]	Numer CAS	Klasa chemiczna	Podkategoria *in vivo* GHS ONZ [3]	Podkategoria *in vitro* GHS ONZ [3]
Trójfluorek boru – dwuwodny	13319-75-0	Kwasy nieorganiczne	1A	1A
Kwas azotowy	7697-37-2	Kwasy nieorganiczne	1A	1A
Pentachlorek fosforu	10026-13-8	Prekursory kwasów nieorganicznych	1A	1A
Chlorek walerylu	638-29-9	Chlorki kwasowe	1B	1B
Wodorotlenek sodu	1 310-73-2	Zasady nieorganiczne	1B	1B

▼M8

Substancja ([2])	Numer CAS	Klasa chemiczna	Podkategoria *in vivo* GHS ONZ ([3])	Podkategoria *in vitro* GHS ONZ ([3])
1-(2-Aminoetylo)piperazyna	140-31-8	Aminy alifatyczne	1B	1B
Chlorek benzenosulfonylu	98-09-9	Chlorki kwasowe	1C	1C
N,N-Dimetylobenzyloamina	103-83-3	Anilina	1C	1C
Tetraetylenopentamina	112-57-2	Aminy alifatyczne	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenole	NŻ	NŻ
Akrylan nonylu	2664-55-3	Akrylany/metakrylany	NŻ	NŻ
Wodorowęglan sodu	144-55-8	Sole nieorganiczne	NŻ	NŻ

([1]) Dwanaście wymienionych powyżej substancji zawiera trzy substancje z każdej z trzech podkategorii substancji żrących GHS ONZ i trzy substancje nieżrące; substancje te są łatwo dostępne za pośrednictwem dostawców komercyjnych, a podkategorię GHS ONZ oparto na wynikach wysokiej jakości badań *in vivo*. Substancje te znajdują się w wykazie 40 substancji odniesienia, które wchodzą w skład minimalnego wykazu substancji chemicznych wybranych w celu określenia dokładności i wiarygodności metod badawczych podobnych do zwalidowanej referencyjnej metody badawczej pod względem strukturalnym i funkcjonalnym, a wybrano jest spośród 163 chemicznych substancji odniesienia, które wykorzystywano pierwotnie do zatwierdzania referencyjnej metody badawczej (Corrositex®) (7) (10) (14). Celem tego procesu wyboru było uwzględnienie w największym możliwym stopniu substancji chemicznych, które: były reprezentatywne dla zakresu reakcji żrących (np. substancje niedziałające żrąco; substancje żrące należące do grup opakowaniowych ONZ I, II i III), które można zmierzyć lub przewidzieć przy użyciu zwalidowanej referencyjnej metody badawczej; były reprezentatywne dla klas chemicznych wykorzystywanych podczas procesu walidacji; miały dobrze określoną strukturę chemiczną; dawały odtwarzalne wyniki podczas stosowania zwalidowanej referencyjnej metody badawczej; dawały ostateczne wyniki w referencyjnym badaniu *in vivo*; były dostępne na rynku; oraz nie były związane z wygórowanymi kosztami utylizacji (14).

([2]) Substancje zbadane w postaci czystej lub o czystości ≥ 90 %

([3]) Odpowiadające grupy opakowaniowe ONZ to I, II oraz III odpowiednio dla podkategorii 1A, 1B i 1C GHS ONZ. NŻ: Substancja nieżrąca.

PROCEDURA

12. W poniższych punktach opisano elementy i procedury metody badawczej sztucznej bariery membranowej służące ocenie działania żrącego (7)(15), oparte na obecnej zwalidowanej metodzie referencyjnej, tj. dostępnym na rynku badaniu Corrositex®. Barierę membranową oraz wskaźnik zgodności i roztwory wykorzystywane do kategoryzacji można stworzyć, przygotować lub nabyć, tak jak w przypadku zwalidowanej metody referencyjnej Corrositex®. Dostępny jest protokół próbnej metody badawczej dotyczący zwalidowanej referencyjnej metody badawczej (7). Badanie należy przeprowadzać w temperaturze otoczenia (17–25 °C), a elementy powinny spełniać następujące warunki.

Badanie zgodności badanej substancji chemicznej

13. Przez przystąpieniem do badania bariery membranowej przeprowadza się badanie zgodności w celu określenia, czy system wykrywania substancji chemicznych wykrywa badaną substancję chemiczną. Jeżeli system wykrywania substancji chemicznych nie wykrywa badanej substancji chemicznej, metoda badawcza bariery membranowej nie jest odpowiednia, aby ocenić potencjalne działanie żrące tej szczególnej badanej substancji chemicznej i należy zastosować inną metodę badawczą. System wykrywania substancji chemicznych i warunki narażenia na działanie substancji powinny odzwierciedlać narażenie podczas następującego badania bariery membranowej.

Badanie kategorii skali czasu badanej substancji chemicznej

14. W przypadkach stosownych dla metody badawczej badaną substancję chemiczną zakwalifikowaną na podstawie badania zgodności należy poddać badaniu kategorii skali czasu, tj. badaniu klasyfikacyjnemu pozwalającemu rozróżnić kwasy słabe i mocne lub zasady. Na przykład w zwalidowanej referencyjnej metodzie badawczej badanie kategoryzacji skali czasu wykorzystuje się, aby wskazać, którą z dwóch

▼M8

skal czasu należy wykorzystać w zależności od wykrycia znacznej rezerwy kwasowej lub alkalicznej. Dwie różne skale czasu wytrzymałości należy stosować w celu określenia działania żrącego i podkategorii działania żrącego na skórę GHS ONZ, w zależności od rezerwy kwasowej lub alkalicznej badanej substancji chemicznej.

ELEMENTY METODY BADAWCZEJ BARIERY MEMBRANOWEJ

Bariera membranowa

15. Bariera membranowa składa się z dwóch elementów: białkowego makrocząsteczkowego wodnistego żelu i przepuszczalnej, podtrzymującej membrany. Białkowy żel nie powinien przepuszczać cieczy i substancji stałych, ale może ulec zniszczeniu i stać się przepuszczalny. W pełni zbudowaną barierę membranową należy przechowywać w określonych wcześniej warunkach, które zapobiegają pogorszeniu się jakości żelu, tj. jego wyschnięciu, wzrostowi mikroorganizmów, przesunięciu, krakingowi, które miałyby niekorzystny wpływ na jego działanie. Należy określić dopuszczalny okres przechowywania i nie używać preparatów bariery membranowej po upłynięciu tego okresu.

16. Przepuszczalna podtrzymująca membrana zapewnia mechaniczne podparcie dla białkowego żelu w trakcie procesu formowania żelu i narażenia na badaną substancję chemiczną. Podtrzymująca membrana powinna zapobiegać opadaniu lub przesuwaniu się żelu oraz powinna łatwo przepuszczać wszystkie badane substancje chemiczne.

17. Białkowy żel, składający się z białka, np. keratyny, kolagenu lub mieszanin białek, tworzący macierz żelową, odgrywa rolę celu badanej substancji chemicznej. Materiał białkowy umieszcza się na powierzchni podtrzymującej membrany i umożliwia się wytworzenie z niego żelu przed umieszczeniem bariery membranowej nad roztworem wskaźnika. Żel białkowy powinien mieć taką samą objętość i gęstość na całej powierzchni oraz nie powinny występować w nim pęcherzyki powietrza lub wady, które mogłyby wpłynąć na jego integralność funkcjonalną.

System wykrywania substancji chemicznych

18. Roztwór wskaźnika będący takim samym roztworem, jaki wykorzystano do badania zgodności, powinien reagować na obecność badanej substancji chemicznej. Jako barwnik we wskaźniku pH lub mieszaninę barwników należy stosować np. czerwień krezolową i oranż metylowy, które zmienią swoje zabarwienie w reakcji na obecność badanej substancji chemicznej. System pomiarowy może być wizualny lub elektroniczny.

19. Systemy wykrywania, które opracowano w celu wykrywania przechodzenia badanej substancji chemicznej przez barierę membranową, należy oceniać pod względem ich istotności i wiarygodności w celu wykazania zakresu substancji chemicznych, które można wykryć, i ilościowych granic wykrywalności.

WYKONANIE BADANIA

Zestaw elementów metody badawczej

20. Bariera membranowa umieszczona jest we fiolce (lub w rurce) zawierającej roztwór wskaźnika, w taki sposób, by cała powierzchnia podtrzymującej membrany miała kontakt z roztworem wskaźnika oraz by nie powstawały pęcherzyki powietrza. Należy dopilnować, by bariera zachowała integralność.

▼M8

Podawanie badanej substancji chemicznej

21. Stosowną ilość badanej substancji chemicznej, np. 500 µl cieczy lub 500 mg drobno sproszkowanej substancji stałej (7) nakłada się ostrożnie na górną powierzchnię bariery membranowej i równo po niej rozprowadza. Dla każdej badanej substancji chemicznej i jej odpowiednich kontroli przygotowuje się odpowiednią liczbę kontrprób, np. cztery (7) (zob. pkt 23–25). Odnotowuje się czas stosowania badanej substancji chemicznej na barierę membranową. Aby zapewnić właściwe odnotowanie krótkich okresów działania żrącego, okresy stosowania badanej substancji chemicznej we fiolkach z kontrpróbą bada się z przesunięciem.

Pomiar przenikania przez barierę membranową

22. Należy odpowiednio monitorować każdą fiolkę oraz odnotować czas pierwszej zmiany roztworu wskaźnika, tj. przeniknięcia przez barierę, a także określać upływ czasu między zastosowaniem i przeniknięciem bariery membranowej.

Kontrole

23. Podczas badań, które obejmują stosowanie nośnika lub rozpuszczalnika wraz z badaną substancją chemiczną, nośnik lub rozpuszczalnik powinien być zgodny z układem bariery membrany, tj. nie powinien zmieniać integralności układu bariery membranowej i nie powinien wpływać na działanie żrące badanej substancji chemicznej. W stosownych przypadkach grupę kontrolną rozpuszczalnika (lub nośnika) należy zbadać jednocześnie z badaną substancję chemiczną, aby wykazać zgodność rozpuszczalnika z układem bariery membranowej.

24. Kontrolę dodatnią (żrącą) o średnim działaniu żrącym, np. 110 ± 15 mg wodorotlenek sodu (podkategoria działania żrącego GHS ONZ 1B) (7), należy badać jednocześnie z badaną substancją chemiczną, aby ocenić, czy sposób działania układu badawczego jest akceptowalny. Druga kontrola dodatnia, która należy do takiej samej klasy chemicznej, jak badana substancja chemiczna, może być przydatna, aby ocenić względne potencjał działania żrącego żrącej badanej substancji chemicznej. Należy wybierać kontrole dodatnie o średnim działaniu żrącym (np. należące do podkategorii 1B GHS ONZ), aby wykryć zmiany w czasie przenikania, które mogą być niedopuszczalnie dłuższe lub krótsze niż ustanowiona wartość odniesienia, wskazując tym samym, że układ badawczy nie funkcjonuje prawidłowo. Do tego celu substancje chemiczne o wysokim działaniu żrącym (podkategoria 1A GHS ONZ) lub nieżrące substancje chemiczne mają ograniczoną użyteczność. Żrąca substancja chemiczna należąca do podkategorii 1B GHS ONZ umożliwiłaby wykrywanie zbyt szybkiego lub zbyt wolnego czasu wytrzymałości. Substancję chemiczną żrącą w niewielkim stopniu (podkategoria 1C GHS ONZ) można wykorzystać jako kontrolę dodatnią w celu zmierzenia zdolności metody badawczej do ciągłego rozróżniania substancji chemicznych żrących w niewielkim stopniu od nieżrących substancji chemicznych. Niezależnie od zastosowanego podejścia należy opracować dopuszczalny zakres reakcji w kontroli dodatniej na podstawie wcześniejszego zakresu czasu wytrzymałości dla zastosowanych kontroli dodatnich, takich jak średnia ± 2-3 odchyleń standardowych. Podczas każdego badania należy określić dokładny czas wytrzymałości w odniesieniu do kontroli dodatniej, aby możliwe było wykrycie odchyleń od dopuszczalnego zakresu.

25. Kontrolę ujemną (nieżrącą), np. 10 % kwas cytrynowy, 6 % kwas propanowy (7), również należy zbadać jednocześnie z badaną substancją chemiczną, jako kolejny środek kontroli jakości w celu wykazania integralności funkcjonalnej bariery membranowej.

▼M8

Kryteria dopuszczalności badania

26. Zgodnie z ustanowionymi parametrami czasu dla każdej z podkategorii działań żrących GHS ONZ, czas (w minutach), jaki upłynął od zastosowanie badanej substancji chemicznej na barierę membranową a przeniknięciem bariery, wykorzystuje się w celu przewidzenia działania żrącego badanej substancji chemicznej. Aby badanie można było uznać za dopuszczalne, równoczesna kontrola dodatnia powinna wykazywać oczekiwany czas reakcji przenikania (np. czas wytrzymałości 8–16 minut w przypadku wykorzystania wodorotlenku sodu jako kontroli dodatniej), równoczesna kontrola ujemna nie powinna mieć działania żrącego, a w stosownych przypadkach równoczesna kontrola z rozpuszczalnikiem nie powinna być żrąca, ani nie powinna wpływać na potencjał działania żrącego badanej substancji chemicznej. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania metody zgodnej z niniejszą metodą badawczą, laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną przy użyciu 12 substancji zalecanych w tabeli 2. W przypadku nowych metod zwanych „me-too", opracowanych zgodnie z niniejszą metodą badawczą, które są podobne do zwalidowanej metody referencyjnej pod względem strukturalnym i funkcjonalnym (14), należy zastosować wcześniej określone standardy wykonywania badań, aby wykazać wiarygodność i dokładność nowej metody przed zastosowaniem jej podczas badań regulacyjnych (10).

Interpretacja wyników i klasyfikacja badanych substancji chemicznych pod względem działania żrącego

27. Czas (w minutach), jaki upłynął od zastosowania badanej substancji chemicznej na barierę membranową a przeniknięciem bariery, wykorzystuje się, aby zaklasyfikować badaną substancję chemiczną do podkategorii działania żrącego GHS ONZ (1) oraz, w stosownych przypadkach, do grupy opakowaniowej ONZ (16). Wartości czasu odcięcia dla każdej z trzech podkategorii działania żrącego ustala się dla każdej proponowanej metody badawczej. Ostateczne decyzje dotyczące czasu odcięcia powinny uwzględniać potrzebę ograniczenia zaniżania klasyfikacji zagrożenia związanego z działaniem żrącym (tj. wyników fałszywie ujemnych). Zgodnie z obecną wytyczną dotyczącą badań należy wykorzystać czas odcięcia Corrositex® opisany w tabeli 3, ponieważ model ten stanowi obecnie jedyną metodę badawczą zgodną z wytyczną dotyczącą badań (7).

Tabela 3

Model prognozowania Corrositex®

Średni czas wytrzymałości (min.)		Prognoza GHS ONZ ([3])
Badane substancje chemiczne kategorii 1 ([1]) (określone na podstawie badania kategoryzacji w ramach metody)	Badane substancje chemiczne kategorii 2 ([2]) (określone na podstawie badania kategoryzacji w ramach metody)	
0–3 min.	0–3 min.	Żrąca podkategoria działania żrącego 1A
> 3–60 min.	> 3–30 min.	Żrąca podkategoria działania żrącego 1B
> 60–240 min.	> 30–60 min.	Żrąca podkategoria działania żrącego 1C
> 240 min.	> 60 min.	Substancja nieżrąca

([1]) Badane substancje chemiczne o wysokiej rezerwie kwasowo/zasadowej (6)
([2]) Badane substancje chemiczne o niskiej rezerwie kwasowo/zasadowej (6)
([3]) Podkategorie 1A, 1B i 1C GHS ONZ odpowiadają odpowiednio grupom opakowaniowym ONZ I, II i III

▼**M8**

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

28. Czas (w minutach), jaki upłynął od zastosowania substancji do przeniknięcia bariery w odniesieniu do badanej substancji chemicznej i kontroli dodatnich, należy zgłosić w postaci tabeli jako poszczególne dane dla powtórzeń, a także średnie ± odchylenie standardowe dla każdej próby.

Sprawozdanie z badania

29. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna oraz substancje kontrolne:

— Substancja jednoskładnikowa: dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina: opisana w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników;

— Wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— źródło, numer partii (jeżeli dostępny);

— w stosownych przypadkach obróbka badanej substancji chemicznej/substancji kontrolnej przed badaniem (np. ogrzanie, rozdrobnienie);

— stabilność badanej substancji chemicznej, termin przydatności lub data ponownej analizy, jeżeli są znane;

— warunki przechowywania.

Nośnik:

— identyfikacja, stężenie (jeżeli dotyczy) użyta objętość;

— uzasadnienie wyboru nośnika.

Wykorzystany model bariery membranowej in vitro i protokół, w tym wykazana dokładność i wiarygodność

Warunki badania:

— Opis wykorzystanej aparatury i zastosowanych procedur przygotowania;

— Pochodzenie i skład wykorzystanej bariery membranowej *in vitro*;

— Skład i właściwości roztworu wskaźnika;

— Metoda wykrywania;

— Ilości badanej substancji chemicznej i substancji kontrolnych;

— Liczba kontrprób;

— Opis i uzasadnienie badania kategoryzacji skali czasu;

▼M8

— Metoda zastosowania;

— Okresy obserwacji;

— Opis stosowanych kryteriów oceny i klasyfikacji;

— Wykazanie efektywności w wykonywaniu metody badawczej przed rutynowym użyciem poprzez badanie substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości.

Wyniki:

— Tabelaryczne zestawienie poszczególnych danych surowych dotyczących poszczególnych badań i próbek kontrolnych dla każdej kontrpróby;

— opis innych zaobserwowanych skutków;

— ustalona na tej podstawie klasyfikacja w odniesieniu do modelu prognozowania lub zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji.

Omówienie wyników

Wnioski

BIBLIOGRAFIA

(1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie piąte zmienione, ONZ Nowy Jork i Genewa 2013. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Rozdział B.4 niniejszego załącznika, Ostre działanie drażniące na skórę.

(3) Rozdział B.40bis niniejszego załącznika, *Badanie działania żrącego na skórę metodą In Vitro: metoda badawcza z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka.*

(4) Rozdział B.40 niniejszego załącznika, Badanie działania żrącego na skórę *in vitro*: *Test przezskórnej oporności elektrycznej (TER)*.

(5) OECD (2015). *Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion.* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 203, Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(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. i 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*" nr 12, s. 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.* [W:] Publikacja NIH nr 99-4495, NIEHS.

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. i Maibach H.I. (1994). *Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials.* [W:] In vitro *Skin Toxicology: Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10*, s. 37–45.

▼**M8**

(9) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 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.* Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: 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, Italy,* „ATLA" nr 29, s. 96–97.

(12) U.S. DOT (2002). *Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision),* (20 września 2002 r.). Waszyngton: U.S. DOT.

(13) Rozdział B.46 niniejszego załącznika, *Badanie podrażnień skóry* in vitro*: Metoda badania z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka.* ICCVAM (2004). *ICCVAM Recommended Performance Standards for In Vitro Test Methods for Skin Corrosion.* [W:] Publikacja NIH nr 04-4510, NIEHS. Dostępne na stronie internetowej: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). *Method 1120, Dermal Corrosion*. Dostępne na stronie internetowej: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ), *UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8)*, ONZ, 2013. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf

▼M8

Dodatek

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności wyników zastosowanej metody badawczej z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem »zgodność« na określenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (9).

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

System wykrywania substancji chemicznych: Wizualny lub elektroniczny system pomiarowy zawierający roztwór wskaźnika, który reaguje na obecność badanej substancji chemicznej, np. przez zmianę barwy barwnika we wskaźniku pH lub mieszanin barwników, które zmienią swoje zabarwienie w reakcji na obecność badanej substancji chemicznej, lub przez inny rodzaj reakcji chemicznych lub elektromechanicznych.

Zgodność: jest to miara efektywności metody badawczej w odniesieniu do metod badawczych, które dają wyniki kategoryczne i jest ona jednym z aspektów istotności. To określenie jest czasami stosowane wymiennie z określeniem „dokładność”; definiuje się jako odsetek wszystkich badanych substancji chemicznych, które są prawidłowo sklasyfikowane jako dodatnie lub ujemne. Zgodność jest w dużym stopniu uzależniona od przewagi dodatnich wyników w rodzajach badanej substancji chemicznej (9).

GHS (Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów): system obejmujący klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki, mające informować na temat szkodliwego działania tych substancji chemicznych w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) oraz środowiska (1).

IATA: zintegrowane podejście do badań i oceny.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór składający się z co najmniej dwóch substancji.

Substancja jednoskładnikowa: substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

Substancja wieloskładnikowa: substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu ≥ 10 % (w/w) i < 80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się w wyniku zmieszania co najmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

NŻ: substancja niemająca działania żrącego.

Standardy wykonywania badań (PS): normy oparte na zwalidowanej metodzie badania, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badawczej, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się (i) istotne elementy metody badania; (ii) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania dopuszczalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz (iii) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badawczej, który proponowana metoda badania powinna osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia (9).

▼**M8**

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono istotne i użyteczne dla konkretnego celu. Jest to zakres, w jakim metoda badawcza prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badania (9).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej (9).

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki kategoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (9).

Działanie żrące na skórę *in vivo*: powstanie nieodwracalnego uszkodzenia skóry; tj. widocznej martwicy przebiegającej przez naskórek w głąb skóry, spowodowanej naniesieniem badanej substancji chemicznej na okres nieprzekraczający czterech godzin. Reakcjami na działanie żrące są wrzody, krwotoki, krwawiące strupy oraz – po zakończeniu 14-dniowej obserwacji – odbarwienia wynikłe ze zblednięcia skóry, obszary jednolitej alopecji, a także blizny. Celem oceny wątpliwych uszkodzeń można przeprowadzić badanie histopatologiczne.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki kategoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (9).

Substancja: pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

▼M8

B.66 **STABILNIE TRANSFEKOWANA TRANSAKTYWACJA W BADANIACH *IN VITRO* DO WYKRYWANIA AGONISTÓW i ANTAGONISTÓW RECEPTORA ESTROGENOWEGO**

WPROWADZENIE OGÓLNE

Wytyczna OECD dotycząca badań w oparciu o wyniki

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna wytycznej OECD dotyczącej badań (TG) nr 455 (2016). TG 455 jest wytyczną dotyczącą badań w oparciu o wyniki, która opisuje metodykę stabilnie transfekowanej transaktywacji w testach *in vitro* do wykrywania agonistów i antagonistów receptora estrogenowego (badania aktywacji transkrypcji receptora estrogenowego – ER TA). Obejmuje ona szereg metod badań podobnych pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym mających na celu określenie agonistów lub antagonistów receptora estrogenowego (tj. ERα, lub ERβ), które powinny ułatwiać opracowanie nowych – podobnych lub zmienionych – metod badawczych zgodnie z zasadami walidacji określonymi w wytycznych OECD *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (1). W pełni zwalidowane referencyjne metody badań (dodatek 2 i dodatek 3), które stanowią podstawę tej wytycznej dotyczącej badań w oparciu o wyniki, to:

— test stabilnie transfekowanej transaktywacji (STTA) (2) wykorzystaniem linii komórkowej (h) ERα-HeLa-9903; oraz

— test VM7Luc ER TA (3) przy użyciu linii komórkowej VM7Luc4E2 ([1]), która wyraża przede wszystkim hERα z niewielkim udziałem hERβ(4)(5).

W celu opracowania i walidacji podobnych testów dotyczących tego samego punktu końcowego zagrożenia dostępne są standardy wykonywania badań (6) (7), które należy stosować. Umożliwiają one terminową zmianę wytycznej dotyczącej badań w oparciu o wyniki nr 455, aby do zaktualizowanej wytycznej dotyczącej badań w oparciu o wyniki można było dodać nowe podobne testy; podobne testy zostaną jednak dodane dopiero po przeglądzie przeprowadzonym przez OECD i po uzgodnieniu przez tę organizację, że standardy wykonywania badań zostały spełnione. Testy ujęte w wytycznej dotyczącej badań nr 455 można stosować w sposób nieograniczony w celu spełnienia wymogów państw członkowskich OECD w zakresie wyników badań dotyczących transaktywacji receptora estrogenowego przy jednoczesnym korzystaniu z wzajemnego uznawania danych OECD.

Kontekst i zasady dotyczące testów zawartych w niniejszej metodzie badawczej

2. W 1998 r. OECD podjęła działania o wysokim priorytecie, mające na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych dotyczących badań na potrzeby badań klasyfikacyjnych i badań substancji potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. W 2012 r. zmieniono ramy koncepcyjne OECD dotyczące badania i oceny substancji

([1]) Do czerwca 2016 r. linia ta była oznaczona jako linia komórkowa BG1Luc. Jako pierwszy komórki BG-1 opisał Geisinger *et al.* (1998) (35), po czym ich charakterystykę opracowali badacze z Narodowego Instytutu Nauk o Zdrowiu Środowiskowym (36). Stosunkowo niedawno odkryto, że istnieją dwie różne odmiany komórek BG-1 stosowanych przez badaczy – BG-1 Fr i BG-1 NIEHS. Wnikliwa analiza, w tym badanie DNA tych dwóch odmiennych linii komórkowych BG-1 przeprowadzone przez Li *et al.* (2014) (37) wykazała, że BG-1 Fr była niepowtarzalna i że linia BG-1 NIEHS, tj. pierwotna linia komórkowa stosowana do opracowania badania, nie była linią komórkową ludzkiego raka jajnika, lecz odmianą linii komórkowej ludzkiego raka piersi MCF7. Linia komórkowa stosowana w badaniu znana pod nazwą BG1Luc4E2 (38) będzie obecnie nosiła nazwę VM7Luc4E2 („V” = odmiana; „M7” = komórki MCF7). Analogiczny test będzie obecnie określany jako „badanie aktywacji transkrypcji receptora estrogennego VM7Luc” („test VM7Luc ER TA”). Chociaż powoduje to zmianę pochodzenia linii komórkowej, na której opiera się test, to nie ma wpływu ani na opublikowane badania walidacyjne, ani na użyteczność i stosowanie tego testu do celów rozpoznawania estrogenowych/antyestrogenowych substancji chemicznych.

▼M8

potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Oryginalne i zmienione ramy koncepcyjne uwzględniono jako załączniki do wytycznych OECD *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption* (8). Ramy koncepcyjne składają się z pięciu poziomów, a każdy z nich odpowiada innemu poziomowi złożoności biologicznej. Transaktywacja receptora estrogenowego opisana w niniejszej metodzie badawczej należy do poziomu 2, który obejmuje „testy *in vitro* dostarczające danych na temat wybranych mechanizmów/ścieżek układy hormonalnego". Niniejsza metoda badawcza dotyczy testów transaktywacji *in vitro* stworzonych, aby określić agonistów i antagonistów receptora estrogenowego.

3. Interakcja estrogenów z receptorami estrogenowymi może wpłynąć na transkrypcję genów regulowanych przez estrogen, co może prowadzić do indukcji lub inhibicji procesów komórkowych, w tym tych koniecznych do proliferacji komórek, prawidłowego rozwoju płodu i funkcji reprodukcyjnej (9)(10)(11). Zakłócenie prawidłowego układu estrogenowego może potencjalnie wywołać niekorzystny wpływ na prawidłowy rozwój (ontogenezę), zdrowie reprodukcyjne i integralność układu rozrodczego.

4. Badania aktywacji transkrypcji *in vitro* opierają się na bezpośredniej lub pośredniej interakcji między substancjami zawierającymi szczególny receptor, który reguluje transkrypcję produktu genu reporterowego. Takie testy wykorzystywano w dużym stopniu w celu oceny ekspresji genów regulowanej przez szczególne receptory jądrowe, takie jak receptory estrogenowe (12)(13)(14)(15)(16). Proponowano je w celu wykrywania transaktywacji estrogenu regulowanej przez receptor estrogenowy (17)(18)(19). Istnieją co najmniej dwa główne podtypy jądrowych receptorów estrogenowych, α i β, które są zakodowane przez odrębne geny. Odpowiednie białka mają różne biologiczne funkcje, a także różny rozkład w tkankach i powinowactwo wiązania ligandów (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). Jądrowy ERα pośredniczy w klasycznej reakcji estrogennej (27)(28)(29)(30) i z związku z tym większość opracowywanych obecnie modeli mających na celu zmierzenie aktywacji lub inhibicji ER dotyczy ERα. Badania wykonuje się w celu określenia substancji chemicznych, które aktywują (lub hamują) receptor estrogenowy w następstwie wiązania ligandów, po którym kompleks receptor-ligand wiąże się z określonymi elementami reakcji DNA oraz transaktywuje gen reporterowy, powodując zwiększoną ekspresję komórkową białka markerowego. Podczas testów można wykorzystać różne reakcje genów reporterowych. W układach opartych na lucyferazie enzym lucyferaza przekształca substrat lucyferyny w produkt bioluminescencyjny, który można zmierzyć ilościowo przy użyciu luminometru. Inne przykłady częstych genów reporterowych obejmują białko fluorescencji i gen *LacZ*, który koduje β-galaktozydazę, enzym przetwarzający bezbarwny substrat X-gal (5- bromo-4-chloro-indolilo-galaktopiranozyd) w niebieski produkt, który można określić ilościowo przy użyciu spektrofotometru. Te geny reporterowe można ocenić w szybki i niedrogi sposób, wykorzystując dostępne na rynku zestawy badawcze.

5. Badania walidacyjne dotyczące badań aktywacji transkrypcji STTA i VM7Luc wykazały istotność i wiarygodność tych metod w odniesieniu do ich przeznaczenia (3)(4)(5)(30). Standardy wykonywania badań dotyczące testów ER TA opartych na luminescencji przy użyciu linii komórkowych raka piersi zawarto w dokumencie ICCVAM *Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method:* An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3). Te standardy wykonywania badań zmieniono, aby miały zastosowanie zarówno do badań aktywacji transkrypcji STTA jak i VM7Luc (2).

6. Definicje i skróty stosowane w niniejszej metodzie badawczej opisano w dodatku 1.

▼M8

Zakres badań aktywacji transkrypcji i związane z nimi ograniczenia

7. Testy te proponuje się do celów badań przesiewowych i ustalania substancji priorytetowych, ale mogą one dostarczać również informacji mechanistycznych, które można wykorzystać w ramach podejścia opartego na wadze dowodów. Testy te dotyczą transaktywacji wywołanej przez substancję chemiczną wiążącą się z receptorami estrogenowymi w układzie *in vitro*. W związku z tym wyników nie należy ekstrapolować bezpośrednio do złożonej sygnalizacji i regulacji nieuszkodzonego układu hormonalnego *in vivo*.

8. Transaktywację, w której pośredniczą ER, uznaje się za jeden z kluczowych mechanizmów zaburzania funkcjonowania układu hormonalnego, chociaż istnieją także inne mechanizmy, które mogą wywołać zaburzenia funkcjonowania układu hormonalnego, między innymi (i) interakcje z innymi receptorami i układami enzymatycznymi w układzie hormonalnym, (ii) synteza hormonów, (iii) aktywacja metaboliczna lub dezaktywacja hormonów, (iv) dystrybucja hormonów do tkanek docelowych i (v) usunięcie hormonów z ciała. Żaden z testów wchodzących w skład niniejszej metody badawczej nie dotyczy tych sposobów działania.

9. Niniejsza metoda badawcza dotyczy zdolności substancji chemicznych do aktywowania (tj. działania jako agoniści), a także do hamowania (tj. działania jako antagoniści) transkrypcji zależnej od ER. Niektóre substancje chemiczne, które w zależności od rodzaju komórek wykazują zarówno działanie agonistyczne, jak i antagonistyczne, określa się jako selektywne modulatory receptora estrogenowego (SERM). Substancje chemiczne, które w tych testach dają wynik ujemny, można ocenić za pomocą testu wiązania ER przed stwierdzeniem, że dana substancja chemiczna nie wiąże się z receptorem. Ponadto testy mogą zapewnić informacje wyłącznie dotyczące działanie pierwotnej molekuły, biorąc pod uwagę ograniczone zdolności metaboliczne układów komórek *in vitro*. Biorąc pod uwagę, że podczas walidacji wykorzystano jedynie pojedyncze substancje, nie zbadano zastosowania do mieszanin stosowanych w badaniu. Teoretycznie metoda badawcza może jednak mieć zastosowanie do badania zarówno substancji wieloskładnikowych, substancji o nieznanym lub zmiennym składzie, złożonych produktów reakcji lub materiały biologicznych, jak i mieszanin. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej w odniesieniu do substancji wieloskładnikowej, UVCB lub mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

10. Do celów informacyjnych w tabeli 1 przedstawiono wyniki testu agonisty 34 substancji, które zbadano za pomocą obu w pełni zwalidowanych referencyjnych metod badań opisanych w niniejszej metodzie badawczej. 26 z tych substancji sklasyfikowano jako jednoznacznych agonistów ER a 8 jako ujemne na podstawie opublikowanych sprawozdań, w tym testów *in vitro* wiązania i transaktywacji lub testu wzrostu macicy (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). W tabeli 2 przedstawiono wyniki testu antagonistycznego 15 substancji, które zbadano za pomocą obu w pełni zwalidowanych referencyjnych metod badań opisanych w niniejszej metodzie badawczej. Cztery z tych substancji sklasyfikowano jako jednoznacznych/przypuszczalnych antagonistów ER a 10 jako ujemne na podstawie opublikowanych sprawozdań, w tym testów *in vitro* wiązania i transaktywacji ER (2)(3)(18)(31). Jeżeli chodzi o dane podsumowane w tabeli 1 i tabeli 2, wyniki obu referencyjnych metod badawczych dotyczące klasyfikacji wszystkich substancji, poza jedną (mifepryston), w odniesieniu do testu antagonisty były stuprocentowo zgodne, a wszystkie substancje sklasyfikowano prawidłowo jako agonistów/antagonistów ER lub jako substancje ujemne. Dodatkowe informacje dotyczące tej grupy substancji chemicznych, a także dodatkowe substancje chemiczne zbadane za pomocą testów STTA i VM7Luc ER TA podczas badań walidacyjnych zawarto w dodatku 2 (tabela 1, 2 i 3) do standardów wykonywania badań ER TA (6)(7).

▼M8

Tabela 1

Przegląd wyników testów STTA i VM7Luc ER TA dotyczących substancji zbadanych za pomocą obu testów agonistycznych, które sklasyfikowano jako agonistów ER dodatnich (DOD.) lub ujemnych (UJEM.)

	Substancja	Numer CAS	Test STTA [1]			Test VM7Luc ER TA [2]		Źródło danych do celów klasyfikacji [4]		
			Działanie ER TA	wartość PC_{10} (M)	wartość PC_{50} [b] (M)	Działanie ER TA	Wartość EC_{50} [b], [3] (M)	Inne testy ER TA [c]	Wiązanie ER	Wzrost macicy
1	17β-estradiol [1]	50-28-2	DOD.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	DOD.	$5{,}63 \times 10^{-12}$	DOD. (227/227)	DOD.	DOD.
2	17α-estradiol [1]	57-91-0	DOD.	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	DOD.	$1{,}40 \times 10^{-9}$	DOD. (11/11)	DOD.	DOD.
3	Etynyloestradiol 17-α [1]	57-63-6	DOD.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	DOD.	$7{,}31 \times 10^{-12}$	DOD. (22/22)	DOD.	DOD.
4	17β-trenbolon	10161-33-8	DOD.	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	DOD.	$4{,}20 \times 10^{-8}$	DOD. (2/2)	NB	NB
5	19-nortestosterone [1]	434-22-0	DOD.	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	DOD.	$1{,}80 \times 10^{-6}$	DOD. (4/4)	DOD.	DOD.
6	4-kumylfenol [1]	599-64-4	DOD.	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	DOD.	$3{,}20 \times 10^{-7}$	DOD. (5/5)	DOD.	NB
7	4-*tert*-Oktylofenol [1]	140-66-9	DOD.	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	DOD.	$3{,}19 \times 10^{-8}$	DOD. (21/24)	DOD.	DOD.
8	Apigenin [1]	520-36-5	DOD.	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	DOD.	$1{,}60 \times 10^{-6}$	DOD. (26/26)	DOD.	NB
9	Atrazyn [1]	1912-24-9	UJEM.	—	—	UJEM.	—	UJEM. (30/30)	UJEM.	NB
10	Bisfenol A [1]	80-05-7	DOD.	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	DOD.	$5{,}33 \times 10^{-7}$	DOD. (65/65)	DOD.	DOD.
11	Bisfenol B [1]	77-40-7	DOD.	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	DOD.	$1{,}95 \times 10^{-7}$	DOD. (6/6)	DOD.	DOD.
12	Ftalan benzylu butylu [1]	85-68-7	DOD.	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	DOD.	$1{,}98 \times 10^{-6}$	DOD. (12/14)	DOD.	UJEM.

▼M8

	Substancja	Numer CAS	Test STTA [1]			Test VM7Luc ER TA [2]		Źródło danych do celów klasyfikacji [4]		
			Działanie ER TA	wartość PC_{10} (M)	wartość PC_{50} [b] (M)	Działanie ER TA	Wartość EC_{50} [b], [3] (M)	Inne testy ER TA [c]	Wiązanie ER	Wzrost macicy
13	Kortykosteron [1]	50-22-6	UJEM.	—	—	UJEM.	—	UJEM. (6/6)	UJEM.	NB
14	Kumestrol [1]	479-13-0	DOD.	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	DOD.	$1{,}32 \times 10^{-7}$	DOD. (30/30)	DOD.	NB
15	Daidzein [1]	486-66-8	DOD.	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	DOD.	$7{,}95 \times 10^{-7}$	DOD. (39/39)	DOD.	DOD.
16	Dietylostylbestrol [1]	56-53-1	DOD.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	DOD.	$3{,}34 \times 10^{-11}$	DOD. (42/42)	DOD.	NB
17	Ftalan di-n-butylu	84-74-2	DOD.	$4{,}09 \times 10^{-6}$		DOD.	$4{,}09 \times 10^{-6}$	DOD. (6/11)	DOD.	UJEM.
18	Etyloparaben	120-47-8	DOD.	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(PC_{50} nie występuje)	DOD.	$2{,}48 \times 10^{-5}$	DOD.		NB
19	Estron [1]	53-16-7	DOD.	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	DOD.	$2{,}34 \times 10^{-10}$	DOD. (26/28)	DOD.	DOD.
20	Genistein [1]	446-72-0	DOD.	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	DOD.	$2{,}71 \times 10^{-7}$	DOD. (100/102)	DOD.	DOD.
21	Haloperydol	52-86-8	UJEM.	—	—	UJEM.	—	UJEM. (2/2)	UJEM.	NB
22	Kemferol [1]	520-18-3	DOD.	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	DOD.	$3{,}99 \times 10^{-6}$	DOD. (23/23)	DOD.	NB
23	Kepone [1]	143-50-0	DOD.	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	DOD.	$4{,}91 \times 10^{-7}$	DOD. (14/18)	DOD.	NB
24	Ketokonazol	65277-42-1	UJEM.	—	—	UJEM.	—	UJEM. (2/2)	UJEM.	NB
25	Linuron [1]	330-55-2	UJEM.	—	—	UJEM.	—	UJEM. (8/8)	UJEM.	NB
26	mezoheksestrol [1]	84-16-2	DOD.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	DOD.	$1{,}65 \times 10^{-11}$	DOD. (4/4)	DOD.	NB
27	Metylotestosteron [1]	58-18-4	DOD.	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	DOD.	$2{,}68 \times 10^{-6}$	DOD. (5/6)	DOD.	NB

▼M8

	Substancja	Numer CAS	Test STTA [1]			Test VM7Luc ER TA [2]		Źródło danych do celów klasyfikacji [4]		
			Działanie ER TA	wartość PC_{10} (M)	wartość PC_{50} [b] (M)	Działanie ER TA	Wartość EC_{50} [b], [3] (M)	Inne testy ER TA [c]	Wiązanie ER	Wzrost macicy
28	Moryna	480-16-0	DOD.	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	DOD.	$2{,}37 \times 10^{-6}$	DOD. (2/2)	DOD.	NB
29	Noretynodrel [1]	68-23-5	DOD.	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	DOD.	$9{,}39 \times 10^{-10}$	DOD. (5/5)	DOD.	NB
30	*p,p*'-Metoksychlor [1]	72-43-5	DOD.	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(PC_{50} nie występuje) [a]	DOD.	$1{,}92 \times 10^{-6}$	DOD. (24/27)	DOD.	DOD.
31	Fenobarbital [1]	57-30-7	UJEM.	—	—	UJEM.	—	UJEM. (2/2)	UJEM.	NB
32	Rezerpina	50-55-5	UJEM.	—	—	UJEM.	—	UJEM. (4/4)	UJEM.	NB
33	Spironolakton [1]	52-01-7	UJEM.	—	—	UJEM.	—	UJEM. (4/4)	UJEM.	NB
34	Testosteron	58-22-0	DOD.	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	DOD.	$1{,}75 \times 10^{-5}$	DOD. (5/10)	DOD.	NB

Skróty: Numer CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service; M = molowy; EC_{50} = połowa maksymalnego stężenia efektywnego badanej substancji; UJEM. = ujemny; DOD. = dodatni; NB = nie badano; PC_{10} (and PC_{50}) = stężenie badanej substancji, przy którym reakcja stanowi 10 % (lub 50 % w przypadku PC_{50}) reakcji kontroli dodatniej (E2, 1nM) na każdej płytce.

([a]) Wspólne substancje badane w ramach testów STTA i VM7Luc ER TA, które zostały określone jako agoniści ER lub ujemne i wykorzystane do oceny dokładności w badaniu walidacyjnym VM7Luc ER TA (sprawozdanie oceniające ICCVAM dotyczące VM7Luc ER TA, tabela 4-1 (3)).

([b]) Maksymalne stężenie badane bez ograniczeń wynikających z cytotoksyczności lub nierozpuszczalności wynosiło 1×10^{-5} M (test STTA) i 1×10^{-3} M (test VM7Luc ER TA).

([c]) Liczba w nawiasie oznacza wyniki badania sklasyfikowane jako dodatnie (DOD) lub ujemne (UJEM.) we wszystkich badań referencyjnych.

([1]) Wartości zgłoszone w projekcie sprawozdania *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 Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([3]) Średnie wartości EC_{50} zostały obliczone na podstawie wartości zgłoszonych przez laboratoria badania walidacyjnego VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3).

([4]) Klasyfikacja jako agonista ER lub jako substancja ujemna została oparta na informacjach zawartych w dokumentach ICCVAM Background Review Documents (BRD) w odniesieniu do metod badań ER Binding i TA (31) oraz informacjach uzyskanych z publikacji wydanych i poddanych przeglądowi po zakończeniu ICCVAM BRD (2)(3)(18)(31)(33)(34).

Uwagi: Nie we wszystkich testach przeprowadzanych w ramach niniejszej metody badawczej mierzy się te same wartości. W niektórych przypadkach obliczenie EC_{50} nie jest możliwe, ponieważ nie dochodzi do wygenerowania pełnej krzywej dawka-odpowiedź. Chociaż w teście STTA wartość PC_{10} jest kluczowym pomiarem, mogą istnieć również dalsze przykłady, w których wartość PC_x dostarczy przydatnych informacji.

▼M8

Tabela 2

Porównanie wyników testów STTA i VM7Luc ER TA dotyczących substancji zbadanych za pomocą obu testów antagonisty, które sklasyfikowano jako antagonistów ER dodatnich (DOD.) lub ujemnych (UJEM.)

	Substancja [a]	Numer CAS	Test STTA ER [1]		Test VM7Luc ER TA [2]		Potencjalne wyniki ER STTA [4]	Uzgodniona klasyfikacja ICCVAM [5]	Klasa chemiczna MeSH [6]	Klasa produktowa [7]
			Działanie ER TA	wartość IC_{50} [b] (M)	Działanie ER TA	wartość IC_{50} [b], [3] (M)				
1	4-hydroksy-tamoksyfen	68047-06-3	DOD.	$3{,}97 \times 10^{-9}$	DOD.	$2{,}08 \times 10^{-7}$	umiarkowany DOD.	DOD.	Węglowodór (cykliczny)	Produkt leczniczy
2	Dibenzo[a,h]antracen	53-70-3	DOD.	IC_{50} nie występuje	DOD.	IC_{50} nie występuje	DOD.	ZD	Związek policykliczny	Laboratoryjna substancja chemiczna, produkt naturalny
3	Mifepryston	84371-65-3	DOD.	$5{,}61 \times 10^{-6}$	UJEM.	—	umiarkowany DOD	UJEM.	Steryd	Produkt leczniczy
4	Chlorowodorek raloksyfenu	82640-04-8	DOD.	$7{,}86 \times 10^{-10}$	DOD.	$1{,}19 \times 10^{-9}$	umiarkowany DOD.	DOD.	Węglowodór (cykliczny)	Produkt leczniczy
5	Tamoksyfen	10540-29-1	DOD.	$4{,}91 \times 10^{-7}$	DOD.	$8{,}17 \times 10^{-7}$	DOD.	DOD.	Węglowodór (cykliczny)	Produkt leczniczy
6	17β-estradiol	50-28-2	UJEM.	—	UJEM.	—	ZU	ZU	Steryd	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny

▼M8

	Substancja ([a])	Numer CAS	Test STTA ER ([1])		Test VM7Luc ER TA ([2])		Potencjalne wyniki ER STTA ([4])	Uzgodniona klasyfikacja ICCVAM ([5])	Klasa chemiczna MeSH ([6])	Klasa produktowa ([7])
			Działanie ER TA	wartość IC_{50} ([b]) (M)	Działanie ER TA	wartość IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
7	Apigenin	520-36-5	UJEM.	—	UJEM.	—	UJEM.	UJEM.	Związek heterocykliczny	Barwnik, produkt naturalny, półprodukt farmaceutyczny
8	Atrazyna	1912-24-9	UJEM.	—	UJEM.	—	UJEM.	ZU	Związek heterocykliczny	Herbicyd
9	Ftalan di-n-butylu	84-74-2	UJEM.	—	UJEM.	—	UJEM.	UJEM.	Ester, Kwas ftalowy	Składnik kosmetyczny, przemysłowa substancja chemiczna, plastyfikator
10	Fenarymol	60168-88-9	UJEM.	—	UJEM.	—	nie badano	ZU	Związek heterocykliczny, pirymidyna	Środek grzybobójczy
11	Flawon	525-82-6	UJEM.	—	UJEM.	—	ZU	ZU	Flawonoid, związek heterocykliczny	Produkt naturalny, produkt leczniczy
12	Flutamid	13311-84-7	UJEM.	—	UJEM.	—	UJEM.	ZU	Amidy	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
13	Genisteina	446-72-0	UJEM.	—	UJEM.	—	ZU	UJEM.	Flawonoid, związek heterocykliczny	Produkt naturalny, produkt leczniczy

▼M8

	Substancja ([a])	Numer CAS	Test STTA ER ([1])		Test VM7Luc ER TA ([2])		Potencjalne wyniki ER STTA ([4])	Uzgodniona klasyfikacja ICCVAM ([5])	Klasa chemiczna MeSH ([6])	Klasa produktowa ([7])
			Działanie ER TA	wartość IC_{50} ([b]) (M)	Działanie ER TA	wartość IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
14	p-n-nonylofenol	104-40-5	UJEM.	—	UJEM.	—	nie badano	UJEM.	Fenol	Półprodukt
15	Resweratrol	501-36-0	UJEM.	—	UJEM.	—	ZU	UJEM.	Węglowodór (cykliczny)	Produkt naturalny

Skróty: Numer CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service; M = molowy; IC_{50} = połowa maksymalnego stężenia hamującego badanej substancji; UJEM. = ujemny; ZU = zakładany ujemne; DOD. = dodatni; ZD = zakładany dodatni.

([a]) Wspólne substancje badane w ramach testów STTA i VM7Luc ER TA, które zostały określone jako antagoniści ER lub ujemne ER i wykorzystane do oceny dokładności w badaniu walidacyjnym VM7Luc ER TA (2)(3).

([b]) Maksymalne stężenie badane bez ograniczeń wynikających z cytotoksyczności lub nierozpuszczalności wynosiło 1×10^{-3} M (test STTA) i 1×10^{-5} M (test VM7Luc ER TA).

([1]) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, część B (2)

([2]) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([3]) Średnie wartości IC_{50} zostały obliczone na podstawie wartości zgłoszonych przez laboratoria badania walidacyjnego VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3).

([4]) Działanie STTA ER założone na podstawie zgłoszonych wyników tych testów znanych dzięki danym historycznym CERI dotyczącym testu wiązania ER, testowi wzrostu macicy i zestawionym informacjom z ogólnie dostępnych publikacji (2)

([5]) Klasyfikacja jako antagonista ER lub jako ujemny ER została oparta na informacjach zawartych w dokumentach ICCVAM Background Review Documents (BRD) w odniesieniu do testów ER Binding i TA (31) oraz informacjach uzyskanych z publikacji wydanych i poddanych przeglądowi po zakończeniu ICCVAM BRD (2)(3)(18)(31).

([6]) Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy chemicznej przy użyciu Medical Subject Headings (MeSH) amerykańskiej National Library of Medicine – międzynarodowo uznanego znormalizowanego systemu klasyfikacji (dostępnego na stronie http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy produktowej przy użyciu bazy danych substancji niebezpiecznych amerykańskiej National Library of Medicine (dostępnej na stronie http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

ELEMENTY TESTU ER TA

Istotne elementy testu

11. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do testów, podczas których wykorzystuje się stabilnie transfekowany lub endogenny receptor estrogenowy alfa oraz stabilnie transfekowany konstrukt genu reporterowego podlegający kontroli co najmniej jednego elementu reakcji na estrogen; mogą jednak występować inne receptory, takie jak ERβ. Są to istotne elementy testu.

Kontrole

12. Należy opisać podstawę proponowanych równoległych wzorców referencyjnych dla każdego testu agonisty i antagonisty. Jednoczesne kontrole (ujemne, z rozpuszczalnikiem i dodatnie) w stosownych przypadkach służą jako wskazówka, że test działa w warunkach badania, a także stanowią podstawę porównań między doświadczeniami; kontrole te wchodzą zwykle w skład kryteriów dopuszczalności danego doświadczenia (1).

Standardowe procedury kontroli jakości

13. Standardowe procedury kontroli jakości należy przeprowadzać jak opisano dla każdego testu w celu zapewnienia, by każda linia komórkowa utrzymywała stabilność przez wiele pasaży, by pozostawała niezanieczyszczona mykoplazmą (tj. niezanieczyszczona skażeniem bakteryjnym) oraz by zachowała zdolność do zapewnienia oczekiwanych reakcji, w których pośredniczy ER, na przestrzeni czasu. Należy przeprowadzić dalszą kontrolę linii komórkowych, aby sprawdzić ich właściwą tożsamość, a także inne zanieczyszczenia (np. grzyby, drożdże i wirusy).

Wykazanie biegłości laboratorium

14. Przed przeprowadzeniem badania nieznanych substancji chemicznych przy użyciu któregokolwiek z testów przeprowadzanych w ramach niniejszej metody badawczej każde laboratorium powinno wykazać biegłość w stosowaniu testu. Aby wykazać biegłość, każde laboratorium powinno zbadać 14 substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w tabeli 3 w odniesieniu do testu agonisty i 10 substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w tabeli 4 w odniesieniu do testu antagonisty. To badanie biegłości potwierdzi również reaktywność układu badawczego. Wykaz substancji służących do wykazania biegłości stanowi podzbiór substancji odniesienia przedstawionych w standardach wykonywania badań dotyczących testów ER TA (6). Substancje te są dostępne na rynku, należą do klas substancji chemicznych łączących się często z aktywnością agonistów lub antagonistów ER, wykazują odpowiedni zakres siły działania oczekiwanej w przypadku agonistów/antagonistów ER (tj. wysoki lub słaby) oraz obejmują substancje ujemne. Badanie substancji służących do wykazania biegłości należy powtórzyć co najmniej dwukrotnie, w innych dniach. Biegłość wykazuje się w drodze poprawnej klasyfikacji (dodatnia/ujemna) każdej substancji służącej do wykazania biegłości. Podczas nauki przeprowadzania testów każdy technik powinien powtórzyć badanie biegłości. W zależności od rodzaju komórki, niektóre z tych substancji służących do wykazania biegłości mogą zachowywać się jak SERM i wykazywać działanie zarówno agonistyczne, jak i antagonistyczne. Substancje służące do wykazania biegłości są jednak sklasyfikowane w tabelach 3 i 4 według ich znanego i dominującego działania, które należy wykorzystać w celu oceny biegłości.

15. Aby wykazać efektywność oraz do celów kontroli jakości każde laboratorium powinno stworzyć bazy danych historycznych dotyczących działania agonistycznego i antagonistycznego wraz z wzorcami referencyjnymi (np. 17β-estradiol i tamoksyfen), substancjami chemicznymi służącymi do kontroli dodatniej i ujemnej i danymi dotyczącymi kontroli z rozpuszczalnikiem (np. DMSO). Na początek bazę danych należy wygenerować z co najmniej 10 niezależnych prób dotyczących agonistów (np. 17β-estradiol) i 10 niezależnych serii badawczych antagonistów (np. tamoksyfen). Wyniki przyszłych analiz tych wzorców referencyjnych i kontroli z rozpuszczalnikiem należy dodawać do bazy danych, aby ją powiększyć, co pozwoli z czasem zapewnić spójność i efektywność testu biologicznego przeprowadzanego przez laboratorium.

▼M8

Tabela 3

Wykaz (14) substancje służące do wykazania biegłości w odniesieniu do testu agonisty [1]

Nr [8]	Substancja	Numer CAS	Przewidywana reakcja [2]	Test STTA			Test VM7Luc ER TA		Klasa chemiczna MeSH [6]	Klasa produktowa [7]
				wartość PC_{10} (M) [3]	wartość PC_{50} (M) [3]	Zakres badanych stężeń (M)	Wartość EC_{50} VM7Luc (M) [4]	Najwyższe stężenie na potrzeby ustalenia zakresu dawkowania (M) [5]		
14	Dietylostylbestrol	56-53-1	DOD.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} – 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Węglowodór (cykliczny)	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
12	17α-estradiol	57-91-0	DOD.	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steryd	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
15	*mezoheksestrol*	84-16-2	DOD.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Węglowodór (cykliczny), fenol	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
11	4-*tert*-oktylofenol	140-66-9	DOD.	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenol	Półprodukt
9	Genisteina	446-72-0	DOD.	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flawonoid, związek heterocykliczny	Produkt naturalny, produkt leczniczy
6	Bisfenol A	80-05-7	DOD.	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenol	Półprodukt

▼M8

Nr ([8])	Substancja	Numer CAS	Przewidywana reakcja ([2])	Test STTA			Test VM7Luc ER TA		Klasa chemiczna MeSH ([6])	Klasa produktowa ([7])
				wartość PC_{10} (M) ([3])	wartość PC_{50} (M) ([3])	Zakres badanych stężeń (M)	Wartość EC_{50} VM7Luc (M) ([4])	Najwyższe stężenie na potrzeby ustalenia zakresu dawkowania (M) ([5])		
2	Kemferol	520-18-3	DOD.	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flawonoid, związek heterocykliczny	Produkt naturalny
3	Ftalan benzylu butylu	85-68-7	DOD.	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Kwas karboksylowy, ester, kwas ftalowy	Plastyfikator, przemysłowa substancja chemiczna
4	*p,p*'-Metoksychlor	72-43-5	DOD.	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Węglowodór (halogenowany)	Pestycyd, środek weterynaryjny
1	Etyloparaben	120-47-8	DOD.	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Kwas karboksylowy, fenol	Produkt leczniczy, konserwant
17	Atrazyna	1912-24-9	UJEM.	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Związek heterocykliczny	Herbicyd
20	Spironolakton	52-01-7	UJEM.	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lakton, Steryd	Produkt leczniczy
21	Ketokonazol	65277-42-1	UJEM.	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Związek heterocykliczny	Produkt leczniczy

▼M8

Nr ([8])	Substancja	Numer CAS	Przewidywana reakcja ([2])	Test STTA			Test VM7Luc ER TA		Klasa chemiczna MeSH ([6])	Klasa produktowa ([7])
				wartość PC_{10} (M) ([3])	wartość PC_{50} (M) ([3])	Zakres badanych stężeń (M)	Wartość EC_{50} VM7Luc (M) ([4])	Najwyższe stężenie na potrzeby ustalenia zakresu dawkowania (M) ([5])		
22	Rezerpina	50-55-5	UJEM.	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Związek heterocykliczny, indol	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny

Skróty: Numer CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service; EC_{50} = połowa maksymalnego stężenia efektywnego badanej substancji; UJEM. = ujemny; DOD. = dodatni; PC_{10} (and PC_{50}) = stężenie badanej substancji, przy którym reakcja stanowi 10 % (lub 50 % w przypadku PC_{50}) reakcji kontroli dodatniej (E2, 1nM) na każdej płytce.

([1]) Klasyfikacja jako dodatnie lub ujemne działanie agonistyczne ER została oparta na dokumentach ICCVAM Background Review Documents (BRD) w odniesieniu do testów ER Binding i TA (31) oraz na danych empirycznych i innych informacjach uzyskanych z badań porównawczych wydanych i poddanych przeglądowi po zakończeniu ICCVAM BRD (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34).

([2]) Wartości zgłoszone w projekcie sprawozdania *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]) Średnie wartości EC_{50} zostały obliczone na podstawie wartości zgłoszonych przez laboratoria badania walidacyjnego VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3).

([4]) Zgłoszone stężenia były najwyższymi zbadanymi stężeniami (badanie ustalające zakres) podczas walidacji testu VM7Luc ER TA. Jeżeli stężenia różniły się między laboratoriami, zgłaszane jest najwyższe stężenie. Zob. tabela 4–10 w sprawozdaniu oceniającym metodę badawczą ICCVAM; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

([5]) Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy chemicznej przy użyciu Medical Subject Headings (MeSH) amerykańskiej National Library of Medicine, międzynarodowo uznanego znormalizowanego systemu klasyfikacji (dostępnego na stronie http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy produktowej przy użyciu bazy danych substancji niebezpiecznych amerykańskiej National Library of Medicine (dostępnej na stronie http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

([7]) Z tabeli 1 (wykaz chemicznych substancji odniesienia (22) do celów oceny dokładności agonisty ER) zawartej w standardach wykonywania badań (6)

([8]) Jeżeli substancja służąca do wykazania biegłości nie jest już dostępna na rynku, można wykorzystać substancję o takiej samej kwalifikacji i porównywalnej sile działania, sposobie działania i klasie chemicznej.

▼M8

Tabela 4

Wykaz (10) substancji służących do wykazania biegłości w odniesieniu do testu antagonisty

	Substancja (a)	Numer CAS	Test STTA ER (1)			Test VM7Luc ER TA (2)			Potencjalne wyniki ER STTA (1)	ICCVAM (5) ICCVAM 5	Klasa chemiczna MeSH (6)	Klasa produktowa (7)
			Działanie ER TA	IC_{50} (M)	Zakres badanych stężeń (M)	Działanie ER TA	IC_{50} (3) (M)	Najwyższe stężenie na potrzeby ustalenia zakresu dawkowania (M) (4)				
1	4-hydroksy-tamoksyfen	68047-06-3	DOD.	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	DOD.	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	umiarkowany DOD.	DOD.	Węglowodór (cykliczny)	Produkt leczniczy
2	Chlorowodorek raloksyfenu	82640-04-8	DOD.	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	DOD.	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	umiarkowany DOD.	DOD.	Węglowodór (cykliczny)	Produkt leczniczy
3	Tamoksyfen	10540-29-1	DOD.	$4{,}91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	DOD.	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	DOD.	DOD.	Węglowodór (cykliczny)	Produkt leczniczy
4	17β-estradiol	50-28-2	UJEM.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	UJEM.	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	będą ujemne (*)	ZU	Steryd	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
5	Apigenin	520-36-5	UJEM.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	UJEM.	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	UJEM.	UJEM.	Związek heterocykliczny	Barwnik, produkt naturalny, półprodukt farmaceutyczny
6	Ftalan di-n-butylu	84-74-2	UJEM.	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	UJEM.	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	UJEM.	UJEM.	Ester, Kwas ftalowy	Składnik kosmetyczny, przemysłowa substancja chemiczna, plastyfikator

▼M8

	Substancja ([a])	Numer CAS	Test STTA ER ([1])			Test VM7Luc ER TA ([2])			Potencjalne wyniki ER STTA ([1])	ICCVAM ([5]) ICCVAM 5	Klasa chemiczna MeSH ([6])	Klasa produktowa ([7])
			Działanie ER TA	IC_{50} (M)	Zakres badanych stężeń (M)	Działanie ER TA	IC_{50} ([3]) (M)	Najwyższe stężenie na potrzeby ustalenia zakresu dawkowania (M) ([4])				
7	Flawon	525-82-6	UJEM.	—	10^{-8} – 10^{-3}	UJEM.	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	będą ujemne (*)	ZU	Flawonoid, związek heterocykliczny	Produkt naturalny, produkt leczniczy
8	Genisteina	446-72-0	UJEM.	—	10^{-9} – 10^{-4}	UJEM.	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	będą ujemne (*)	UJEM.	Flawonoid, związek heterocykliczny	Produkt naturalny, produkt leczniczy
9	p-n-nonylofenol	104-40-5	UJEM.	—	10^{-9} – 10^{-4}	UJEM.	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	nie badano	UJEM.	Fenol	Półprodukt
10	Resweratrol	501-36-0	UJEM.	—	10^{-8} – 10^{-3}	UJEM.	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	będą ujemne (*)	UJEM.	Węglowodór (cykliczny)	Produkt naturalny

Skróty: Numer CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service; M = molowy; IC_{50} = połowa maksymalnego stężenia hamującego badanej substancji; UJEM. = ujemny; ZU = zakładany ujemne; DOD. = dodatni

(*) sklasyfikowano jako ujemne zgodnie z przeglądem bibliografii (2).

([1]) Wspólne substancje badane w ramach testów STTA i VM7Luc ER TA, które zostały oznaczone jako antagoniści ER lub ujemne ER i wykorzystane do oceny dokładności w badaniu walidacyjnym VM7Luc ER TA (2)(3).

([2]) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, część B (2)

([3]) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([4]) Średnie wartości IC_{50} zostały obliczone na podstawie wartości zgłoszonych przez laboratoria badania walidacyjnego VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3).

([5]) Zgłoszone stężenia były najwyższymi zbadanymi stężeniami (badanie ustalające zakres) podczas walidacji testu VM7Luc ER TA. Jeżeli stężenia różniły się między laboratoriami, zgłaszane jest najwyższe stężenie. Zob. tabele 4–11 w ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

([6]) Klasyfikacja jako antagonista ER lub jako ujemny została oparta na informacjach zawartych w dokumentach ICCVAM Background Review Documents (BRD) w odniesieniu do metod badań ER Binding i TA (31) oraz informacjach uzyskanych z publikacji wydanych i poddanych przeglądowi po zakończeniu ICCVAM BRD (2)(3)(18)(31).

([7]) Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy chemicznej przy użyciu Medical Subject Headings (MeSH) amerykańskiej National Library of Medicine – międzynarodowo uznanego znormalizowanego systemu klasyfikacji (dostępnego na stronie http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([8]) Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy produktowej przy użyciu bazy danych substancji niebezpiecznych amerykańskiej National Library of Medicine (dostępnej na stronie http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

Kryteria dopuszczalności serii badawczej

16. Akceptacji lub odrzucenia serii badawczej dokonuje się na podstawie oceny wyników uzyskanych w odniesieniu do wzorców referencyjnych i kontroli stosowanych w przypadku każdego doświadczenia. Wartości PC_{50} (EC_{50}) lub IC_{50} w odniesieniu do wzorców referencyjnych powinny spełniać kryteria dopuszczalności przewidziane dla wybranego testu (dla STTA zob. dodatek 2, dla VM7Luc ER TA zob. dodatek 3), a wszystkie kontrole dodatnie/ujemne powinny być prawidłowo sklasyfikowane w odniesieniu do każdego zaakceptowanego doświadczenia. Zdolność do spójnego przeprowadzania testu należy wykazać poprzez opracowanie i utrzymywanie bazy danych historycznych w odniesieniu do wzorców referencyjnych i kontroli (zob. pkt 15). Odchylenia standardowe (SD) lub współczynniki zmienności (CV) dla środków parametrów dopasowania krzywej wzorców referencyjnych z wielu doświadczeń mogą być stosowane jako miara odtwarzalności laboratoryjnej. Ponadto powinny być spełnione następujące zasady dotyczące kryteriów dopuszczalności:

— Dane powinny być wystarczające do ilościowej oceny aktywacji receptora estrogenowego (dla testu agonisty) lub jego supresji (dla testu antagonisty) (tj. skuteczności i siły działania).

— Średnia aktywność reporterowa w odniesieniu do referencyjnego stężenia estrogenów odniesienia powinna być co najmniej równa minimum podanemu w testach dotyczących kontroli z nośnikiem (z rozpuszczalnikiem) w celu zapewnienia odpowiedniej czułości. W odniesieniu do testów STTA i VM7Luc ER TA jest to czterokrotność średniej grupy kontrolnej nośnika na każdej płytce.

— Badane stężenia powinny pozostać w zakresie rozpuszczalności badanych substancji chemicznych i nie powinny wykazywać cytotoksyczności.

Analiza danych

17. Zdefiniowana procedura interpretacji danych w odniesieniu do każdego testu powinna być stosowana do klasyfikacji odpowiedzi dodatniej i ujemnej.

18. Spełnienie kryteriów dopuszczalności (pkt 16) wskazuje, że test funkcjonuje prawidłowo, ale nie gwarantuje, że którakolwiek konkretna seria badawcza dostarczy dokładnych danych. Powtarzanie się wyników pierwszej serii badawczej stanowi najlepszą wskazówkę, że dostarczono dokładnych danych. Jeżeli dwie serie badawcze dają odtwarzalne wyniki (np. obie serie badawcze wskazują, że badana substancja chemiczna jest dodatnia), wykonanie trzeciej serii nie jest konieczne.

19. Jeżeli dwie serie badawcze nie dają odtwarzalnych wyników (np. badana substancja chemiczna jest dodatnia w jednej serii, a ujemna w drugiej) lub jeżeli wymagana jest większa pewność co do wyniku tego testu, należy przeprowadzić co najmniej trzy niezależne serie badawcze. W tym przypadku klasyfikacji dokonuje się na podstawie dwóch zgodnych wyników z trzech.

Ogólne kryteria interpretacji danych

20. Obecnie nie istnieje powszechnie uzgodniona metoda interpretacji danych pochodzących z ER TA. Zarówno jakościowe (np. dodatnie/ujemne) jak i ilościowe (np. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) oceny aktywności z udziałem receptora estrogenowego powinny jednak być oparte na danych empirycznych i rzetelnej ocenie naukowej. W przypadku, gdy jest to możliwe, wyniki dodatnie powinny charakteryzować się zarówno wielkością skutku w porównaniu z kontrolą z nośnikiem (z rozpuszczalnikiem) lub estrogenu odniesienia, jak i stężeniem, przy którym występuje skutek (np. EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} itd.).

▼M8

Sprawozdanie z badania

21. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Test:

— zastosowany test;

— kontrola/wzorzec referencyjny/badana substancja chemiczna;

— źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli jest dostępny;

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;

— rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane;

— pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, stosownie do przypadku.

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Rozpuszczalnik/nośnik:

— charakterystyka (charakter, dostawca i partia);

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika;

— rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli są znane.

Komórki:

— rodzaj i źródło komórek:

  • Czy receptor estrogenowy jest endogenicznie wyrażony? Jeśli nie, to który receptor (które receptory) poddano transfekcji?

  • Zastosowany (zastosowane) konstrukt reporterowy (konstrukty reporterowe) (w tym gatunki źródłowe);

  • Metoda transfekcji;

  • Metoda wyboru w odniesieniu do utrzymania stabilnej transfekcji (w stosownych przypadkach);

  • Czy metoda transfekcji jest odpowiednia dla linii stabilnych?

— liczba pasaży komórek (od rozmrożenia);

▼**M8**

— liczba pasaży komórek w momencie rozmrożenia;

— metody utrzymywania kultur komórkowych.

Warunki badania:

— granice rozpuszczalności;

— opis zastosowanych metod oceny żywotności;

— skład podłoża; stężenie CO_2;

— stężenia badanej substancji chemicznej;

— objętość dodanego nośnika i badanej substancji chemicznej;

— temperatura i wilgotność inkubacji;

— czas poddawania działaniu substancji chemicznej;

— zagęszczenie komórek na początku i w trakcie poddania działaniu substancji;

— kontrole dodatnie i ujemne wzorce referencyjne;

— odczynniki reporterowe (nazwa produktu, dostawca i partia);

— kryteria uznania serii badawczej za dodatnią, ujemną lub niejednoznaczną.

Kontrola dopuszczalności:

— krotności indukcji w odniesieniu do każdej płytki testowej oraz czy spełniają one minimum wymagane w ramach tego testu na podstawie historycznych kontroli;

— rzeczywiste wartości w odniesieniu do kryteriów dopuszczalności, np. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ oraz krzywa Hilla w odniesieniu do równoczesnych kontroli dodatnich/wzorców referencyjnych.

Wyniki:

— dane surowe i znormalizowane;

— maksymalny poziom krotności indukcji;

— dane dotyczące cytotoksyczności;

— jeżeli istnieje, najniższe stężenie efektywne (LEC);

— W stosownych przypadkach wartości RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} lub EC_{50};

— w stosownych przypadkach zależność stężenie-odpowiedź;

▼M8

— analizy statystyczne, jeśli takie istnieją, wraz z miarą błędu i wiarygodności (np. SEM, SD, CV lub 95 % CI) oraz opisem sposobu uzyskania tych wartości.

Omówienie wyników

Wniosek

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.* [w:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 34. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(2) OECD (2015). *Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity.* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 225. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(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." nr 58(23), s. 5367–5373.

(5) Rogers J.M. i 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" nr 13(1), s. 67–82.

(6) OECD (2012). *Performance Standards For Stably Transfected Transactivation In Vitro Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455)*. [w:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 173. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(7) OECD (2015). *Performance Standards For Stably Transfected Transactivation* In Vitro *Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists.* [w:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 174. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(8) OECD (2012). *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption.* [w:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 150. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(9) Cavailles V. (2002). *Estrogens and Receptors: an Evolving Concept.* „Climacteric" nr 5, suplement 2, s. 20–26.

(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" nr 16(4): s. 1073–1089.

(11) Younes M. i Honma N. (2011). *Estrogen Receptor Beta*. „Arch. Pathol. Lab. Med.", 135(1): s. 63–26.

▼**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" nr 777(1–2), s. 179–189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). *Comparison of* In Vitro *and* In Vivo *Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities*. „Toxicol. Sci." nr 89(1), s. 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" nr 126(2), s. 91–98.

(15) R.D. Combes, (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" nr 28(1), s. 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." nr 71(10), s. 1459–1469.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). *Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens*. „Toxicol. Lett." nr 102–103, s. 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" nr 163(3), s. 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" nr 243(1), s. 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" nr 82(12), s. 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" nr 299(2), s. 204–211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). *Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists*. „Mol. Pharmacolog." nr 54(1), s. 105–112.

(25) Deroo B.J. i Buensuceso A.V. (2010). *Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies*. „Molecular Endocrinology" nr 24(9), s. 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" nr 230(8), s. 558–568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. i Peck E.J.Jr. (1972). *The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses*. „Biochemical and Biophysical Research Communications" nr 48(6), s. 1460–1468.

▼**M8**

(28) Toft D. (1972). *The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA*. „Journal of Steroid Biochemistry" nr 3(3), s. 515–522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), *Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus*. „Recent Progress in Hormone Research" nr 24, s. 45–80.

(30) E.V. Jensen *et al.* (1967), *Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues*. „Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale" nr 56(3), s. 547–569.

(31) ICCVAM (2002). *Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay*. Dodatek D, *Substances Tested in the ER TA Assay*. NIH Publication Report (Nr 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." nr 109, s. 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." nr 111, s. 1530–1549.

(34) J. Kanno *et al.* (2003), *The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies*. „Environ. Health Persp." nr 111, s. 1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989), *Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors*. „Cancer" nr 63, s. 280–288.

(36) Baldwin *et al.* (1989), *BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth* in vitro. „In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal" nr 34, s. 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." nr 28, s. 2072–2081.

(38) J.M. Rogers i M.S. Denison (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." nr 13, s. 67–82.

▼M8

Dodatek 1

DEFINICJE I SKRÓTY

Kryteria dopuszczalności: minimalne normy dotyczące przeprowadzania kontroli doświadczalnych i wzorców referencyjnych. Aby doświadczenie zostało uznane za ważne, należy spełnić wszystkie kryteria dopuszczalności.

Dokładność (zgodność): stopień zgodności wyników testu z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności testu i jeden z aspektów jego istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na określenie odsetka prawidłowych wyników testu (1).

Agonista: Substancja, która powoduje reakcję, np. transkrypcję, gdy wiąże się z określonym receptorem.

Antagonista: Rodzaj receptora liganda lub substancji chemicznej, która nie wywołuje reakcji biologicznej po związaniu z receptorem, ale blokuje lub tłumi reakcje agonistów.

Działanie antyestrogenne: oznacza zdolność substancji chemicznej do hamowania działania 17β-estradiolu przekazywanego przez receptory estrogenowe.

Morfologia komórki: Kształt i wygląd komórek wyhodowanych w jednowarstwowej hodowli w pojedynczym dołku płytki do hodowli tkankowych. Umierające komórki często wykazują nieprawidłową morfologię komórkową.

CF: ramy koncepcyjne OECD dotyczące testowania i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego.

Poddanie działaniu węgla drzewnego / dekstranu: Oczyszczanie surowicy stosowanej w hodowli komórkowej. Poddanie działaniu węgla drzewnego/dekstranu (często nazywane „odpędzaniem") powoduje usunięcie endogennych hormonów i białek wiążących hormony.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Cytotoksyczność: Szkodliwe skutki dla struktury lub funkcji komórki, które mogą ostatecznie spowodować śmierć komórki i mogą być odzwierciedlone przez zmniejszenie liczby komórek w dołku pod koniec okresu narażenia lub zmniejszenie zdolności do pomiaru funkcji komórkowej w porównaniu z równoczesną grupą kontrolną nośnika.

CV: Współczynnik zmienności

DCC-FBS: Pokryta dekstranem bydlęca surowica płodowa poddana działaniu węgla drzewnego.

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

DMSO: Sulfotlenek dimetylu

E2: 17β-estradiol

EC50: Połowa maksymalnego stężenia efektywnego badanej substancji chemicznej.

ED: zaburzenia endokrynologiczne

hERα: ludzki receptor estrogenowy alfa

▼**M8**

hERß: ludzki receptor estrogenowy beta

EFM: podłoże bez estrogenu. Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) uzupełniony 4,5 % bydlęcą surowicą płodową poddaną działaniu węgla drzewnego / dekstranu, 1,9 % L-glutaminą i 0,9 % Pen-Strep.

ER: receptor estrogenowy

ERE: element reakcji estrogenowej

Aktywność estrogenna: zdolność substancji chemicznej do naśladowania 17β-estradiolu w jego zdolności do wiązania się z receptorami estrogenowymi i aktywowania ich receptorów. Za pomocą niniejszej metody badawczej można wykryć aktywność estrogenną za pośrednictwem hERα.

ERTA: transaktywacja receptora estrogenowego

FBS: bydlęca surowica płodowa

HeLa: nieśmiertelna ludzka linia komórek szyjki macicy

HeLa9903: subklon komórkowy HeLa, do którego dokonano stabilnej transfekcji ludzkiego receptora estrogenowegoααi genu reporterowego lucyferazy

IC_{50}: połowa maksymalnego stężenia efektywnego badanej hamującej substancji chemicznej.

ICCVAM: Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych.

Odtwarzalność międzylaboratoryjna: miara zakresu, w jakim różne wykwalifikowane laboratoria, przy użyciu tego samego protokołu i testując tę samą badaną substancję, mogą uzyskać jakościowo i ilościowo podobne wyniki. Odtwarzalność międzylaboratoryjna jest ustalana w ramach procesów poprzedzających walidację i obejmujących walidację i wskazuje, w jakim stopniu test można z powodzeniem przekazywać między laboratoriami: nazywana jest również odtwarzalnością międzylaboratoryjną (1).

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna: ustalenie stopnia, w jakim wykwalifikowani pracownicy w tym samym laboratorium mogą z powodzeniem odtworzyć wyniki, stosując szczegółowy protokół w różnych momentach. Nazywana również „odtwarzalnością laboratoryjną” (1).

LEC: najniższe stężenie efektywne to najniższe stężenie badanej substancji chemicznej, które powoduje reakcję (tj. najniższe stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym krotność indukcji jest statystycznie różna niż równoległa grupa kontrolna nośnika).

Badanie me-too: potoczne określenie testu, które jest strukturalnie i funkcjonalnie podobne do zwalidowanej i zaakceptowanej referencyjnej metody badania. Stosowane zamiennie z podobną metodą badań.

MT: metalotioneina

MMTV: wirus mysiego nowotworu gruczołu piersiowego

OHT: 4-hydroksy-tamoksyfen

PBTG: wytyczne dotyczące badań w oparciu o wyniki

▼M8

PC (kontrola dodatnia): silnie aktywna substancja, najlepiej 17ß-estradiol, która jest włączona do wszystkich badań w celu zapewnienia prawidłowego funkcjonowania testu.

PC_{10}: stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym mierzona aktywność w ramach testu agonisty wynosi 10 % maksymalnej aktywności wywołanej przez PC (E2 dla 1nM w odniesieniu do analizy STTA) na każdej płytce.

PC_{50}: stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym mierzona aktywność w ramach testu agonisty wynosi 50 % maksymalnej aktywności wywołanej przez PC (E2 przy referencyjnym stężeniu określonym w metodzie badawczej) na każdej płytce.

PC_{Max}: stężenie badanej substancji chemicznej wywołujące RPC_{Max}

Standardy wykonywania badań (PS): normy oparte na zwalidowanym teście, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanego testu, który jest podobny do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: 1) istotne elementy testu; 2) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia, wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania akceptowalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz 3) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badania, który proponowany test powinien osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia (1).

Substancje służące do wykazania biegłości: podzbiór substancji odniesienia zawartych w standardach wykonywania badań, które mogą być stosowane przez laboratoria w celu wykazania kompetencji technicznych za pomocą znormalizowanej metody badawczej. Kryteria kwalifikacji w przypadku tych substancji obejmują zazwyczaj takie czynniki, jak to, że reprezentują one zakres reakcji, są dostępne na rynku i że dostępne są wysokiej jakości dane porównawcze.

Biegłość: wykazana zdolność do prawidłowego wykonania testu przed badaniem nieznanych substancji.

Estrogen odniesienia (kontrola dodatnia, PC): 17β-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Wzorzec referencyjny: substancja odniesienia wykorzystana do wykazania prawidłowości testu. 17β-estradiol jest wzorcem referencyjnym na potrzeby testów STTA i VM7Luc ER TA.

Referencyjne metody badawcze: Testy oparte na PBTG 455.

Istotność: opis powiązania testu z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest on znaczący i użyteczny z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim test pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć biologiczny skutek będący przedmiotem zainteresowania. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) testu (1).

Wiarygodność: miara zakresu, w jakim test może zostać wykonany w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jego przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją w drodze obliczenia odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej.

RLU: względne jednostki światła.

RNA: kwas rybonukleinowy.

PC_{Max}: maksymalny poziom reakcji wywołanej przez badaną substancję chemiczną, wyrażony jako procent reakcji wywołanej przez 1 nM E2 na tej samej płytce.

▼M8

RPMI: pożywka RPMI 1640 zawierająca 0,9 % Pen-Strep i 8 % bydlęcej surowicy.

Seria badawcza: pojedyncze doświadczenie oceniające działanie substancji chemicznej na wynik biologiczny testu. Każda seria badawcza stanowi kompletne doświadczenie wykonane w dołkach z kontrpróbą komórek pobranych ze wspólnej puli komórek w tym samym czasie.

Niezależna seria badawcza: oddzielne, niezależne doświadczenie oceniające działanie substancji chemicznej na wynik biologiczny testu, przy użyciu komórek z innej puli, świeżo rozcieńczonych substancji chemicznych, przeprowadzane w różne dni lub w tym samym dniu przez różnych pracowników.

SD: odchylenie standardowe.

Czułość: odsetek wszystkich obecnych/aktywnych substancji prawidłowo sklasyfikowanych w ramach testu. Jest to miara dokładności testu, która daje wyniki kategoryczne i stanowi parametr istotny do celów oceny przydatności testu (1).

Swoistość: odsetek wszystkich nieobecnych/nieaktywnych substancji prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności testu, która daje wyniki kategoryczne i stanowi parametr istotny do celów oceny przydatności testu (1).

Stabilna transfekcja: Kiedy DNA jest przenoszone do hodowanych komórek w taki sposób, że jest stabilnie zintegrowane z genomem komórek, co skutkuje stabilną ekspresją genów, których transfekcji się dokonuje. Klony komórek, w odniesieniu do których dokonano stabilnej transfekcji, są wybierane przez stabilne markery (np. odporność na G418).

Test STTA: test stabilnie transfekowanej transaktywacji, badanie aktywacji transkrypcji ERα z wykorzystaniem linii komórkowej HeLa 9903.

Badanie: Pełen zakres prac doświadczalnych wykonanych w celu oceny pojedynczej, specyficznej substancji przy użyciu konkretnego testu. Badanie obejmuje wszystkie etapy, w tym badania rozcieńczenia badanej substancji w pożywce użytej do badań, wstępne serie badawcze zakresu dawkowania, wszystkie niezbędne kompleksowe serie badawcze, analizy danych, zapewnienia jakości, oceny cytotoksyczności itd. Zakończenie badania pozwala na klasyfikację aktywności badanej substancji chemicznej na docelowej toksyczności (tj. aktywna, nieaktywna lub niejednoznaczna), która jest oceniana za pomocą zastosowanej analizy oraz oszacowanie siły działania w stosunku do dodatniej referencyjnej substancji chemicznej.

Substancja: w rozporządzeniu REACH ([1]) substancję zdefiniowano jako „pierwiastek chemiczny lub jego związki w stanie, w jakim występują w przyrodzie lub zostają uzyskane za pomocą procesu produkcyjnego, z wszelkimi dodatkami wymaganymi do zachowania ich trwałości oraz wszelkimi zanieczyszczeniami powstałymi w wyniku zastosowanego procesu, wyłączając rozpuszczalniki, które można oddzielić bez wpływu na stabilność i skład substancji”. Bardzo podobna definicja jest stosowana w kontekście Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (1).

TA (transaktywacja): rozpoczęcie syntezy mRNA w reakcji na specyficzny sygnał chemiczny, taki jak wiązanie estrogenu z receptorem estrogenowym.

([1]) Rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) i utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE. Dz.U. L 304 z 22.11.2007, s. 1.

▼**M8**

Test: w kontekście niniejszej metody badawczej, test jest jedną z metod przyjętych jako ważne dla spełnienia określonych kryteriów efektywności. Elementy testu obejmują na przykład określoną linię komórkową wraz z powiązanymi warunkami wzrostu, specyficzną pożywkę, w której przeprowadzane jest badanie, warunki ustawienia płytki, rozmieszczenie i rozcieńczenia badanych substancji chemicznych wraz z innymi wymaganymi środkami kontroli jakości oraz związane z nimi etapy oceny danych.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Transkrypcja: synteza mRNA.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

Zweryfikowana metoda badawcza: test, w odniesieniu do którego zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zweryfikowana metoda badawcza może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu (1).

Walidacja: proces, za pomocą którego ustalana jest wiarygodność i adekwatność danego podejścia, metody, testu, procesu lub oceny w określonym celu (1).

VC (grupa kontrolna nośnika): rozpuszczalnik używany do rozpuszczania badanych i kontrolnych substancji chemicznych jest badany wyłącznie jako nośnik bez rozpuszczonych substancji chemicznych.

VM7: Unieśmiertelniona komórka gruczolakoraka, która endogennie wyraża receptor estrogenowy.

VM7Luc4E2: linia komórkowa VM7Luc4E2 została wyprowadzona z unieśmiertelnionych komórek gruczolakoraka VM7, które endogennie wyrażają obie formy receptora estrogenowego (ERα i ERβ) i dokonano ich stabilnej transfekcji przy użyciu plazmidu pGudLuc7.ERE. Plazmid zawiera cztery kopie syntetycznego oligonukleotydu zawierającego element reakcji estrogenowej w obszarze promotora powyżej sekwencji kodującej genu wirusa mysiego nowotworu gruczołu piersiowego (MMTV) oraz gen lucyferazy robaczka świętojańskiego.

Słaba kontrola dodatnia: słabo aktywna substancja wybrana z wykazu referencyjnych substancji chemicznych, która jest włączona do wszystkich badań w celu zapewnienia prawidłowego funkcjonowania testu.

▼**M8**

Dodatek 2

TEST TRANSAKTYWACJI STABILNIE TRANSFEKOWANEGO LUDZKIEGO RECEPTORA ESTROGENOWEGO W CELU WYKRYCIA ESTROGENOWEJ DZIAŁANIA AGONISTYCZNEGO I ANTAGONISTYCZNEGO SUBSTANCJI CHEMICZNYCH Z WYKORZYSTANIEM LINII KOMÓRKOWEJ HERA-HELA-9903

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)

1. W niniejszym teście transaktywacji (TA) wykorzystuje się linię komórkową hERα-HeLa-9903 do wykrywania estrogenowej aktywności agonistycznej przekazywanej przez ludzki receptor estrogenowy alfa (hERα). Badanie walidacyjne testu stabilnie transfektowanej transaktywacji (STTA) przeprowadzone przez japoński Instytut Oceny i Badań Substancji Chemicznych (CERI), wykorzystujące linię komórkową hERα-HeLa-9903 do wykrywania estrogenowego działania agonistycznego i antagonistycznego przekazywanego przez ludzki receptor estrogenowy alfa (hERα), dowiodło adekwatności i wiarygodności testu w odniesieniu do jego zamierzonego celu (1).

2. Szczególnym przeznaczeniem tego testu jest wykrywanie transaktywacji za pośrednictwem hERα poprzez pomiar chemiluminescencji jako punktu końcowego. Z powodu nadaktywacji lucyferazowego genu reporterowego zgłoszono jednak sygnały niezwiązane z receptorami pośredniczącymi w luminescencji przy stężeniach fitoestrogenu przekraczających 1 μM (2)(3). Chociaż krzywa dawka-efekt wskazuje, że rzeczywista aktywacja systemu receptora estrogenowego występuje przy niższych stężeniach, w stabilnej transfekcji systemów badania aktywacji transkrypcji receptora estrogenowego należy ostrożnie badać ekspresję lucyferazy uzyskaną przy wysokich stężeniach fitoestrogenów lub podobnych związków chemicznych, co do których przypuszcza się, że wywołują one – podobnie jak fitoestrogeny – nadaktywację lucyferazowego genu reporterowego (dodatek 1).

3. Przed rozpoczęciem stosowania tego testu do celów regulacyjnych należy zapoznać się z sekcjami „WPROWADZENIE OGÓLNE” oraz „ELEMENTY BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”. Definicje i skróty stosowane w niniejszej wytycznej dotyczącej badań opisano w dodatku 2.1.

ZASADA WYKONANIA TESTU (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)

4. Test ten służy do wiązania sygnału receptora estrogenowego z ligandem. Po wiązaniu ligandu kompleks receptor-ligand przenosi się do jądra komórkowego, gdzie wiąże określone elementy odpowiedzi DNA i transaktywuje gen reporterowy lucyferazy robaczka świętojańskiego, powodując zwiększoną ekspresję komórkową enzymu lucyferazy. Lucyferyna jest substratem przekształcanym przez enzym lucyferaza przekształca w produkt bioluminescencyjny, który można zmierzyć ilościowo przy użyciu luminometru. Aktywność lucyferazy można ocenić w szybki i niedrogi sposób, wykorzystując szereg dostępnych na rynku zestawów badawczych.

5. Układ badawczy wykorzystuje linię komórkową hERα-HeLa-9903, pochodzącą z ludzkiego guza szyjki macicy, z dwoma stabilnie wstawionymi konstruktami: (i) konstrukt ekspresji hERαα (kodujący ludzki receptor o pełnej długości), oraz (ii) konstrukt reportera lucyferazy ogniotrwałej, zawierający pięć tandemowych powtórzeń elementu reakcji estrogenowej (ERE) witellogeniny napędzanego przez element promotora TATA metalotioneiny (MT) myszy. Wykazano, że konstrukt genu TATA MT myszy ma najlepszą wydajność i dlatego jest powszechnie stosowany. W konsekwencji linia komórkowa hERα-HeLa-9903 może mierzyć zdolność badanej substancji chemicznej do wywoływania transaktywacji za pośrednictwem hERα ekspresji genu lucyferazy.

▼M8

6. W przypadku testu agonisty receptora estrogenowego interpretacji danych dokonuje się na podstawie tego, czy maksymalny poziom reakcji wywołany przez badaną substancję chemiczną jest równy lub przekracza reakcję agonisty równą 10 % reakcji wywołanej przez maksymalne indukujące (1 nM) stężenie kontroli dodatniej (PC) 17β-estradiolu (E2) (tj. PC_{10}). W przypadku testu antagonisty receptora estrogenowego interpretacji danych dokonuje się na podstawie tego, czy reakcja wykazuje co najmniej 30-procentowa redukcja działania w wyniku reakcji wywołanej przez wzbogacenie kontroli (25 pM E2) bez cytotoksyczności. Analiza danych i interpretacja zostały szczegółowo omówione w pkt 34–48.

PROCEDURA

Linie komórkowe

7. W teście należy wykorzystać stabilnie transfekowaną linię komórkową hERα-HeLa-9903. Przedmiotową linię komórkową można uzyskać od banku komórek Japońskiego Zbioru Zasobów Biologicznych do Celów Badawczych (JCRB) ([1]), po podpisaniu porozumienia o transferze materiału.

8. Do badań należy używać wyłącznie komórek charakteryzujących się tym, że nie zawierają mykoplazmy. RT-PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym) jest metodą do wyboru w odniesieniu do czułego wykrywania zakażenia mykoplazmą (4)(5)(6).

Stabilność linii komórkowej

9. W celu monitorowania stabilności linii komórkowej należy stosować E2, 17α-estradiol, 17α-metylotestosteron i kortykosteron jako wzorce referencyjne na potrzeby testu agonisty, a pełna krzywa zależności stężenie-odpowiedź w zakresie badanego stężenia podanym w tabeli 1 powinna być mierzona co najmniej raz za każdym razem, gdy wykonuje się test, a wyniki powinny być zgodne z wynikami podanymi w tabeli 1.

10. W przypadku testu antagonisty, pełne krzywe stężeń dla dwóch wzorców referencyjnych, tamoksyfenu i flutamidu, powinny być mierzone jednocześnie z każdą serią badawczą. Należy monitorować prawidłową klasyfikację jakościową jako dodatnie lub ujemne w odniesieniu do tych dwóch substancji chemicznych.

Kultura komórkowa i warunki posiewu

11. Komórki powinny być utrzymywane w podłożu Eagle'a bez czerwieni fenolowej, uzupełnionym 60 mg/l antybiotyku kanamycyny i 10 % pokrytej dekstranem, poddanej działaniu węgla drzewnego bydlęcej surowicy płodowej (DCC-FBS), w inkubatorze CO_2 (5 % CO2) w temperaturze 37±1 °C. Po osiągnięciu 75 % – 90 % konfluencji, komórki mogą być hodowane wtórnie w 10 ml 0,4 x 10^5 – 1 x 10^5 komórek/ml w odniesieniu do 100 mm naczynia do kultury komórkowej. Komórki powinny być zawieszone z 10 % FBS-EMEM (który jest taki sam jak EMEM z DCC-FBS), a następnie umieszczone w dołkach mikropłytki z gęstością 1 x 10^4 komórek/(100 µl na dołek). Następnie należy dokonać wstępnej inkubacji komórek w 5 % inkubatorze CO_2 w temperaturze 37 °± 1 °C przez 3 godziny przed narażeniem na działanie substancji chemicznej. Wyroby z tworzyw sztucznych powinny być wolne od aktywności estrogenowej.

12. Aby zachować integralność reakcji, komórki powinny wyrastać z zamrożonego zapasu w kondycjonowanych pożywkach przez więcej niż jeden pasaż i nie powinny być hodowane dłużej niż przez 40 pasaży. W odniesieniu do linii komórkowej hERα-HeLa-9903 będzie to mniej niż trzy miesiące. Efektywność komórek może jednak zostać zmniejszona, jeżeli są one hodowane w nieodpowiednich warunkach hodowli kultur.

([1]) Bank komórek JCRB: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, japoński nr fax: +81-72-641-9812

▼M8

13. DCC-FBS można przygotować w sposób opisany w dodatku 2.2 lub uzyskać ze źródeł komercyjnych.

Kryteria dopuszczalności

Dodatnie i ujemne wzorce referencyjne w odniesieniu do testu agonisty receptora estrogenowego

14. Przed badaniem i w jego trakcie należy zweryfikować reaktywność układu badawczego, stosując odpowiednie stężenia silnego estrogenu: E2, słabego estrogenu (17α-estradiol), bardzo słabego agonisty (17α-metylotestosteron) i substancji ujemnej (kortykosteron). Dopuszczalne wartości zakresu uzyskane z badania walidacyjnego (1) podano w tabeli 1. Te 4 równoległe wzorce referencyjne powinny być włączone do każdego doświadczenia, a wyniki powinny mieścić się w podanych dopuszczalnych granicach. Jeżeli tak nie jest, należy określić przyczynę niespełnienia kryteriów dopuszczalności (np. obsługa komórek oraz surowica i antybiotyki w odniesieniu do jakości i stężenia) i powtórzyć test. Po spełnieniu kryteriów dopuszczalności, w celu zapewnienia minimalnej zmienności wartości EC_{50}, PC_{50} i PC_{10}, niezbędne jest konsekwentne stosowanie materiałów do hodowli komórkowej. Cztery jednoczesne wzorce referencyjne, które powinny być włączone do każdego doświadczenia (przeprowadzanego w tych samych warunkach, w tym w odniesieniu do materiałów, poziomu pasażowania komórek i techników), mogą zapewnić czułość testu, ponieważ PC_{10} trzech dodatnich wzorców referencyjnych powinny mieścić się w dopuszczalnym zakresie, podobnie jak PC_{50} i EC_{50}, w przypadkach gdy można je obliczyć (zob. tabela 1).

Tabela 1

Dopuszczalne wartości zakresu czterech wzorców referencyjnych w odniesieniu do testu agonisty receptora estrogenowego

Nazwa	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Krzywa Hilla	Zakres badania
17β-estradiol (E2) Nr CAS: 50-28-2	-11,4~-10,1	< -11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-estradiol Nr CAS: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Kortykosteron Nr CAS: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-metylotestosteron Nr CAS: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Dodatnie i ujemne wzorce referencyjne w odniesieniu do testu antagonisty receptora estrogenowego

15. Przed badaniem i w jego trakcie należy zweryfikować reaktywność układu badawczego, stosując odpowiednie stężenia substancji dodatniej (tamoksyfen) oraz substancji ujemnej (flutamid). Dopuszczalne wartości zakresu uzyskane z badania walidacyjnego (1) podano w tabeli 2. Te dwa równoległe wzorce referencyjne powinny być włączone do każdego doświadczenia, a wyniki powinny być oceniane jako prawidłowe, jak pokazano w kryteriach. Jeżeli tak nie jest, należy określić przyczynę niespełnienia kryteriów (np. obsługa komórek oraz surowica i antybiotyki w odniesieniu do jakości i stężenia) i powtórzyć test. Ponadto należy obliczyć wartości IC_{50} dla substancji dodatniej (tamoksyfen), a wyniki powinny mieścić się w podanych dopuszczalnych granicach. Po spełnieniu kryteriów dopuszczalności, w celu zapewnienia minimalnej zmienności wartości IC_{50}, niezbędne jest konsekwentne stosowanie materiałów do hodowli komórkowej. Dwa jednoczesne wzorce referencyjne, które powinny być włączone do każdego doświadczenia (przeprowadzanego w tych samych warunkach, jeśli chodzi o materiały, poziom pasażowania komórek i techników), mogą zapewnić czułość testu (zob. tabela 2).

▼M8

Tabela 2

Kryteria i dopuszczalne wartości zakresu dwóch wzorców referencyjnych w odniesieniu do testu antagonisty receptora estrogenowego

Nazwa	Kryteria	$LogIC_{50}$	Zakres badania
Tamoksyfen Nr CAS: 10540-29-1	dodatnie: należy wyliczyć IC50	-5942~-7596	10^{-10}~10^{-5}M
Flutamid Nr CAS: 13311-84-7	ujemne: nie należy obliczać IC30	—	10^{-10}~10^{-5}M

Kontrole dodatnie i grupy kontrolne nośnika

16. Kontrolę dodatnią (PC) w odniesieniu do testu agonistycznego receptora estrogenowego (1 nM E2) oraz w odniesieniu do testu antagonistycznego receptora estrogenowego (10 μM TAM) należy przeprowadzić co najmniej trzykrotnie na każdej płytce. Nośnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej należy zbadać jako grupę kontrolną nośnika (VC) co najmniej trzykrotnie na każdej płytce. Oprócz tej VC, jeżeli w ramach PC używany jest inny nośnik niż badana substancja chemiczna, należy przeprowadzić inną VC co najmniej trzykrotnie na tej samej płytce z PC.

Kryteria jakości w odniesieniu do testu agonisty receptora estrogenowego

17. Średnia aktywność lucyferazy w kontroli dodatniej (1 nM E2) powinna być co najmniej czterokrotnie większa od średniej VC na każdej płytce. Kryterium to ustalono na podstawie wiarygodności wartości punktów końcowych z badania walidacyjnego (historycznie od czterech do trzydziestu razy).

18. W odniesieniu do kontroli jakości testu krotność indukcji odpowiadająca wartości PC_{10} jednoczesnej PC (1 nM E2) powinna być większa niż 1+2SD wartości krotności indukcji (= 1) jednoczesnej VC. Dla celów ustalania priorytetów, wartość PC_{10} może być przydatna do uproszczenia analizy danych wymaganej w porównaniu z analizą statystyczną. Mimo że analiza statystyczna dostarcza informacji na temat istotności, analiza taka nie jest parametrem ilościowym w odniesieniu do potencjału na podstawie stężeń, a zatem jest mniej przydatna do celów ustalania priorytetów.

Kryteria jakości w odniesieniu do testu antagonisty receptora estrogenowego

19. Średnia aktywność lucyferazy we wzbogaceniu kontroli (25 nM E2) powinna być co najmniej czterokrotnie większa od średniej VC na każdej płytce. Kryterium to ustalono na podstawie wiarygodności wartości punktów końcowych z badania walidacyjnego.

20. W odniesieniu do kontroli jakości testu względna aktywacja transkrypcyjna (RTA) 1 nM E2 powinna być większa niż 100 %, RTA 1 μM 4-kydroksytamoksyfenu (OHT) powinna być mniejsza niż 40,6 %, a RTA 100 μM digitoniny (Dig) powinna być mniejsza niż 0 %.

Wykazanie biegłości laboratorium (zob. pkt 14 oraz tabela 3 i 4 w „ELEMENTY BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO” niniejszej metody badawczej).

Nośnik

21. Sulfotlenek dimetylowy (DMSO), lub odpowiedni rozpuszczalnik, o tym samym stężeniu, co w przypadku różnych kontroli dodatnich i ujemnych, a badane substancje chemiczne powinny być stosowane jako jednoczesna kontrola z nośnikiem. Badaną substancję chemiczną należy rozpuścić w nośniku, który rozpuszcza tę badaną substancję chemiczną i jest mieszalny z podłożem komórkowym. Odpowiednie nośniki stanowią woda, etanol (95–100 % czystości) i sufotlenek dimetylowy. Jeżeli stosuje się sufotlenek dimetylowy, poziom nie powinien przekroczyć 0,1 % (obj./obj.). Dla każdego nośnika należy wykazać, że maksymalna zastosowana objętość nie wykazuje właściwości cytotoksycznych i nie ma wpływu na skuteczność testu.

▼M8

Przygotowanie badanych substancji chemicznych

22. Ogólnie rzecz biorąc, badane substancje chemiczne powinny być rozpuszczone w sulfotlenku dimetylowym lub innym odpowiednim rozpuszczalniku i seryjnie rozcieńczane tym samym rozpuszczalnikiem w stosunku 1:10 w celu przygotowania roztworów do rozcieńczenia z podłożem.

Rozpuszczalność i cytotoksyczność: Uwagi dotyczące ustalania zakresu dawkowania

23. Należy przeprowadzić badanie wstępne w celu określenia właściwego zakresu stężeń substancji chemicznych, które mają być badane, oraz w celu upewnienia się, czy badana substancja chemiczna może mieć problemy z rozpuszczalnością i cytotoksycznością. Początkowo substancje chemiczne są badane do maksymalnego stężenia 1 µl/ml, 1 mg/ml lub 1 mM, w zależności od tego, które jest najniższe. Na podstawie zakresu cytotoksyczności lub braku rozpuszczalności zaobserwowanego w badaniu wstępnym, pierwsza określona seria badawcza powinna obejmować badanie substancji chemicznej w ciągach stężeń wzrastających w postępie logarytmicznym, począwszy od maksymalnego dopuszczalnego stężenia (np. 1 mM, 100 µM, 10 µM itd.) oraz odnotowanej obecności zmętnienia, osadu lub cytotoksyczności. Stężenia w drugiej, a w razie potrzeby w trzeciej serii badawczej należy odpowiednio dostosować, aby lepiej scharakteryzować krzywą zależności stężenie-odpowiedź oraz aby uniknąć stężeń, które okazały się nierozpuszczalne lub wywołują nadmierną cytotoksyczność.

24. W odniesieniu do agonistów i antagonistów receptora estrogenowego obecność rosnących poziomów cytotoksyczności może znacząco zmienić lub wyeliminować typową reakcję sigmoidalną i powinna być brana pod uwagę przy interpretacji danych. Należy stosować metody badania cytotoksyczności, które mogą dostarczyć informacji dotyczących 80 % żywotności komórek, wykorzystując odpowiednie testy oparte na doświadczeniu laboratoryjnym.

25. Jeżeli wyniki badania cytotoksyczności wykażą, że stężenie badanej substancji chemicznej zmniejszyło liczbę komórek o przynajmniej 20 %, stężenie to należy uznać za cytotoksyczne, a stężenia na poziomie co najmniej stężenia cytotoksycznego powinny być wyłączone z oceny.

Narażenie na działanie badanej substancji chemicznej oraz struktura płytki testowej

26. Procedurę rozcieńczeń substancji chemicznych (etapy 1 i 2) oraz narażenia komórek (etap 3) można przeprowadzić w następujący sposób:

Etap 1: Każda badana substancja chemiczna powinna być seryjnie rozcieńczona w sulfotlenku dimetylowym lub odpowiednim rozpuszczalniku i dodana do dołków mikropłytki w celu uzyskania końcowych stężeń seryjnych, jak określono we wstępnym badaniu zakresu dawkowania (zazwyczaj w seriach np. 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM i 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)) potrójnego badania.

Etap 2: Rozcieńczenie substancji chemicznej: Najpierw rozcieńczyć 1,5 µl badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku do objętości 500 µl podłoża.

Etap 3: Narażenie komórek na działanie substancji chemicznej: Dodać 50 µl rozcieńczenia z podłożem (przygotowanym w etapie 2) do dołka testowego zawierającego 10^4 komórek/100 µl/dołek.

Zalecana ostateczna objętość podłoża wymagana dla każdego dołka wynosi 150 µl. Próbki do badań i wzorce referencyjne mogą być przyporządkowane w sposób przedstawiony w tabeli 3 i tabeli 4.

▼**M8**

Tabela 3

Przykładowe przyporządkowanie stężenia na płytkach do wzorców referencyjnych na płytce testowej w teście agonisty receptora estrogenowego

Wiersz	17α-metylotestosteron			Kortykosteron			17α-estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	stężenie 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	stężenie 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	stężenie 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	stężenie 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	stężenie 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	stężenie 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	stężenie 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Grupa kontrolna nośnika (0,1 % sulfotlenek dimetylowy); PC: Kontrola dodatnia (1 nM E2)

27. Wzorce referencyjne (E2, 17α-estradiol, 17-μετψλοτεστοστερον ι κορτψκοστερον) ναλε ψ βαδα ω κα δεφ σερι βαδαωχζεφ (ταβελα 3). Dołki kontroli dodatniej poddane działaniu 1 nM E2, w których może nastąpić maksymalna indukcja E2 i dołki kontroli z nośnikiem poddane działaniu sulfotlenku dimetylowego (lub odpowiedniego rozpuszczalnika) należy uwzględnić na każdej płytce testowej (tabela 4). Jeżeli w tym samym doświadczeniu wykorzystywane są komórki z różnych źródeł (np. inna liczba pasaży, różne partie itd.), wzorce referencyjne powinny być badane w odniesieniu do każdego źródła komórek.

Tabela 4

Przykładowe przyporządkowanie stężenia na płytkach do badanych i pochodzących z płytki kontrolnych substancji chemicznych na płytce testowej w teście agonisty receptora estrogenowego

Wiersz	Badana substancja chemiczna nr 1			Badana substancja chemiczna nr 2			Badana substancja chemiczna nr 3			Badana substancja chemiczna nr 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	stężenie 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	stężenie 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	stężenie 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼**M8**

Wiersz	Badana substancja chemiczna nr 1			Badana substancja chemiczna nr 2			Badana substancja chemiczna nr 3			Badana substancja chemiczna nr 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	stężenie 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	stężenie 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	stężenie 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	stężenie 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Grupa kontrolna nośnika (0,1 % sulfotlenek dimetylowy); PC: Kontrola dodatnia (1 nM E2)

Tabela 5

Przykładowe przyporządkowanie stężenia na płytkach do wzorców referencyjnych na płytce testowej w teście antagonisty receptora estrogenowego

Wiersz	Tamoksyfen			Flutamid			Badana substancja chemiczna nr 1			Badana substancja chemiczna nr 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	stężenie 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	stężenie 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	stężenie 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	stężenie 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	stężenie 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	stężenie 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % sulfotlenek dimetylowy	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Grupa kontrolna nośnika (0,1 % sulfotlenek dimetylowy); PC: Kontrola dodatnia (1 nM E2); OHT: 4-hydroksy-tamoksyfen; Dig: Digitonina.

= wzbogacone o 25pM E2

28. Aby ocenić aktywność antagonistyczną substancji chemicznych, dołki testowe znajdujące się w rzędach od A do G powinny być wzbogacone 25 pM E2. Wzorce referencyjne(tamoksyfen i flutamid) należy badać w każdej serii badawczej. Dołki kontroli dodatniej poddane działaniu 1 nM E2, które mogą być wykorzystywane jako kontrola jakości linii komórkowej hERα-HeLa-9903, dołki kontroli z nośnikiem poddane działaniu sulfotlenku dimetylowego (lub odpowiedniego rozpuszczalnika), dołki 0,1 % sulfotlenku dimetylowego poddane działaniu dodatku sulfotlenku dimetylowego do wzbogaconego E2 odpowiadającego „wzbogaceniu kontroli”, dołki poddane działaniu końcowego stężenia 1 µM OHT oraz dołki poddane działaniu 100 µM Dig należy uwzględnić na każdej płytce testowej (tabela 5). Kolejna płytka testowa powinna być wykonana według tego samego układu płytki bez dołków z wzorcami porównawczymi (tabela 6). Jeżeli w tym samym doświadczeniu wykorzystywane są komórki z różnych źródeł (np. inna liczba pasaży, różne partie itd.), wzorce referencyjne powinny być badane w odniesieniu do każdego źródła komórek.

▼M8

Tabela 6

Przykładowe przyporządkowanie stężenia na płytkach do badanych i pochodzących z płytki kontrolnych substancji chemicznych na płytce testowej w teście antagonisty receptora estrogenowego

Wiersz	Badana substancja chemiczna nr 1			Badana substancja chemiczna nr 2			Badana substancja chemiczna nr 3			Badana substancja chemiczna nr 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	stężenie 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	stężenie 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	stężenie 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	stężenie 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	stężenie 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	stężenie 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % sulfotlenek dimetylowy	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Grupa kontrolna nośnika (0,1 % sulfotlenek dimetylowy); PC: Kontrola dodatnia (1 nM E2)j OHT: 4-hydroksytamoksyfen; Dig: Digitonina.

: Wzbogacone o 25pM E2

29. Brak efektów styku powinien zostać potwierdzony, w stosownych przypadkach, a jeśli podejrzewa się efekty styku, należy zmienić układ płytki, aby uniknąć takich efektów. Można na przykład zastosować układ płytek z wyłączeniem dołków skrajnych.

30. Po dodaniu substancji chemicznych należy dokonać inkubacji płytek testowych w 5 % inkubatorze CO_2 w temperaturze 37 °± 1 °C przez 20–24 godzin w celu wywołania produktów genu reporterowego.

31. Należy zwrócić szczególną uwagę na związki charakteryzujące się wysoką lotnością. W takich przypadkach położone obok dołki kontrolne mogą generować fałszywie dodatnie wyniki, co należy uwzględnić w świetle oczekiwanych i historycznych wartości kontroli. W nielicznych przypadkach, w których zmienność może budzić obawy, zaleca się zastosowanie „uszczelniaczy płytek", które podczas badania mogą pomóc w skutecznym odizolowaniu poszczególnych dołków.

32. Aby zapewnić niezależność badań ostatecznych dotyczących tej samej substancji chemicznej, ich powtórki należy przeprowadzać w różne dni.

Test lucyferazy

33. W teście można stosować komercyjny odczynnik do testów lucyferazy [np. System Steady-Glo® Luciferase Assay (Promega, E2510 lub równoważny)] lub standardowy system testów na lucyferazę (np. Promega, E1500 lub równoważny), pod warunkiem spełnienia kryteriów dopuszczalności. Odczynniki testowe należy dobierać na podstawie czułości luminometru, który ma być użyty. W przypadku stosowania standardowego systemu testu lucyferazy przed dodaniem substratu należy użyć odczynnika do lizy kultury komórkowej (np. Promega, E1531 lub równoważnego). Odczynnik lucyferazy należy stosować zgodnie z instrukcjami producenta.

ANALIZA DANYCH

Test agonisty receptora estrogenowego

34. W przypadku testu agonisty receptora estrogenowego w celu uzyskania względnej aktywności transkrypcyjnej do kontroli dodatniej (1 nM E2), sygnały luminescencyjne z tej samej płytki mogą być analizowane według następujących kroków (dopuszczalne są również inne równoważne procesy matematyczne):

Krok 1. Obliczyć średnią wartość VC.

▼M8

Krok 2. Odjąć średnią wartość VC od wartości każdego dołka, aby znormalizować dane.

Krok 3. Obliczyć średnią wartość znormalizowanej PC.

Krok 4. Podzielić znormalizowaną wartość każdego dołka w danej płytce przez średnią wartość znormalizowanej PC (PC = 100 %).

Ostateczną wartością każdego dołka jest względna aktywność transkrypcyjna dla tego dołka w stosunku do reakcji PC.

Krok 5. Obliczyć średnią wartość względnej aktywności transkrypcyjnej dla każdej grupy stężeń badanej substancji chemicznej. Reakcja ma dwa wymiary: uśrednioną aktywność transkrypcyjną (reakcja) i stężenie, przy którym występuje reakcja (zob. następna sekcja).

Kwestie indukcji EC_{50}, PC_{50} i PC_{10}

35. Pełna krzywa zależności stężenie-odpowiedź jest wymagana do obliczenia EC_{50}, ale nie zawsze może być to osiągalne lub praktyczne ze względu na ograniczenia zakresu stężeń w badaniu (na przykład z powodu cytotoksyczności lub problemów z rozpuszczalnością). Ponieważ jednak EC_{50} i maksymalny poziom indukcji (odpowiadający górnej wartości równania Hilla) są parametrami informacyjnymi, parametry te powinny być w miarę możliwości zgłaszane. Aby obliczyć wartość EC50 i maksymalny poziom indukcji, należy skorzystać z odpowiedniego oprogramowania do obliczeń statystycznych (np. oprogramowanie statystyczne Graphpad Prism). Jeśli równanie logistyczne Hilla ma zastosowanie do danych związanych z zależnością stężenie-odpowiedź, EC_{50} należy obliczyć za pomocą następującego równania (7):

Y = najniższa wartość + (najwyższa wartość -najniższa wartość/ (1+10 wykł. ((log EC_{50} -X) x krzywa Hilla)) gdzie:

X oznacza logarytm stężenia; oraz

Y oznacza reakcję i Y przebiega od najniższej wartości do najwyższej w postaci krzywej sigmoidalnej. Najniższa wartość jest ustalona na zero w równaniu logistycznym Hilla.

36. W odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej należy podać następujące informacje:

RPC_{Max}, które oznacza maksymalny poziom reakcji wywołanej przez badaną substancję chemiczną, wyrażony jako procent reakcji wywołanej przez 1 nM E2 na tej samej płytce, a także PC_{Max} (stężenie związane z PC_{Max}); oraz

w przypadku dodatnich substancji chemicznych – stężenia, które indukują PC_{10} oraz, w stosownych przypadkach, PC_{50}.

37. Wartość PCx można obliczyć poprzez interpolację między 2 punktami na współrzędnej X-Y, jednym bezpośrednio powyżej i jednym bezpośrednio poniżej wartości PCx. Jeżeli punkty danych leżące bezpośrednio powyżej i poniżej wartości PCx mają odpowiednio współrzędne (a,b) i (c,d), wówczas wartość PCx można obliczyć przy użyciu następującego równania:

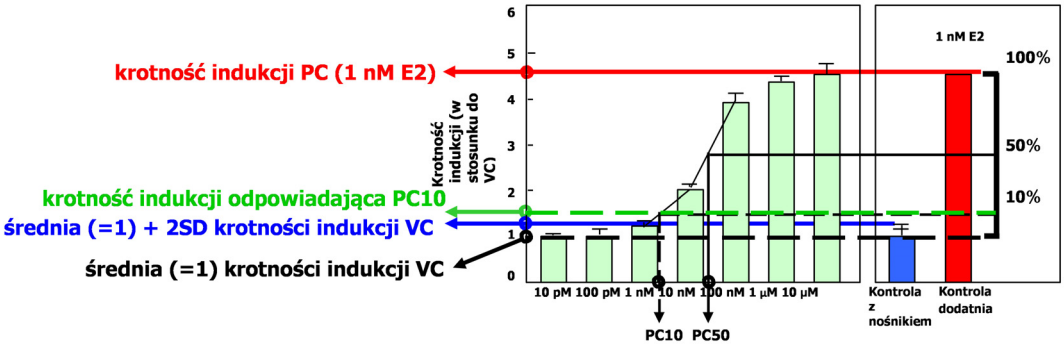
log[PCx] = log[c]+(x-d)/(d-b)

▼M8

38. Opisy wartości PC podano na rysunku 1 poniżej.

Rysunek 1

Przykład wyprowadzania wartości PC. PC (1 nM E2) jest uwzględniony na każdej płytce testowej



Test antagonisty receptora estrogenowego

39. W przypadku testu antagonisty receptora estrogenowego w celu uzyskania względnej aktywności transkrypcyjnej do wzbogacenia kontroli (25 pM E2), sygnały luminescencyjne z tej samej płytki mogą być analizowane według następujących kroków (dopuszczalne są również inne równoważne procesy matematyczne):

Krok 1. Obliczyć średnią wartość VC.

Krok 2. Odjąć średnią wartość VC od wartości każdego dołka, aby znormalizować dane. Krok 3. Obliczyć średnią wartość znormalizowanego wzbogacenia kontroli.

Krok 4. Podzielić znormalizowaną wartość każdego dołka danej płytki przez średnią wartość znormalizowanego wzmocnienia w kontroli (wzbogacenie kontroli = 100 %).

Ostateczną wartością każdego dołka jest względna aktywność transkrypcyjna dla tego dołka w stosunku do wzmocnienia reakcji kontroli.

Krok 5. Obliczyć średnią wartość względnej aktywności transkrypcyjnej dla każdego poddania działaniu substancji.

Parametry indukcji IC_{30} i IC_{50}

40. W przypadku dodatnich substancji chemicznych należy podać stężenia, które indukują IC_{30} oraz, w stosownych przypadkach, IC_{50}.

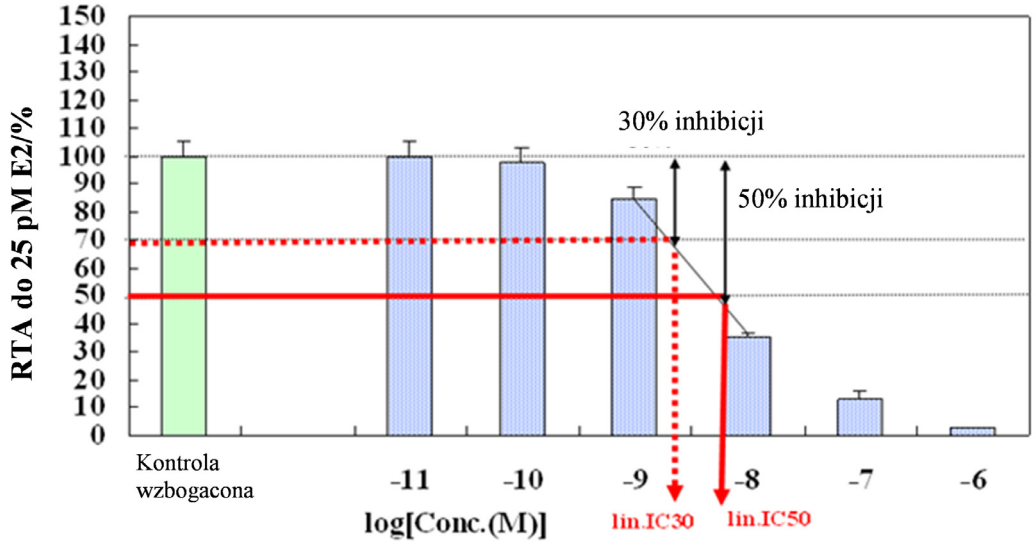
41. Wartość ICx można obliczyć poprzez interpolację między 2 punktami na współrzędnej X-Y, jednym bezpośrednio powyżej i jednym bezpośrednio poniżej wartości ICx. Jeżeli punkty danych leżące bezpośrednio powyżej i poniżej wartości ICx mają odpowiednio współrzędne (c,d) i (a,b), wówczas wartość ICx można obliczyć przy użyciu następującego równania:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

▼M8

Rysunek 2

Przykład wyprowadzania wartości VC. Wzbogacenie kontroli (25 pM E2) jest uwzględnione na każdej płytce testowej



RTA: względna aktywność transkrypcyjna

42. Wyniki powinny opierać się na dwóch (lub trzech) niezależnych seriach badawczych. Jeżeli dwie serie badawcze dają porównywalne i tym samym odtwarzalne wyniki, nie jest konieczne wykonywanie trzeciej serii. Aby wyniki zostały dopuszczone, powinny:

— Spełniać kryteria dopuszczalności (zob. kryteria dopuszczalności pkt 14–22);

— być powtarzalne.

Kryteria interpretacji danych

Tabela 7

Dodatnie i ujemne kryteria podejmowania decyzji w odniesieniu do testu agonisty receptora estrogenowego

Dodatnia	Jeżeli osiągnięto RPC_{Max}, które jest równe lub przekracza 10 % reakcji kontroli dodatniej w co najmniej dwóch z dwóch lub dwóch z trzech serii badawczych.
Ujemna	Jeżeli RPC_{Max} nie osiągnie co najmniej 10 % reakcji kontroli dodatniej w dwóch z dwóch lub dwóch z trzech serii badawczych.

Tabela 8

Dodatnie i ujemne kryteria podejmowania decyzji w odniesieniu do testu antagonisty receptora estrogenowego

Dodatnia	Jeżeli IC_{30} oblicza się w co najmniej dwóch z dwóch lub dwóch z trzech serii badawczych.
Ujemna	Jeżeli IC_{30} nie da się obliczyć w dwóch z dwóch lub dwóch z trzech serii badawczych.

▼M8

43. Kryteria interpretacji danych przedstawiono w tabelach 7 i 8. Wyniki dodatnie będą charakteryzować się zarówno wielkością skutku, jak i stężeniem, przy którym występuje skutek. Wyrażanie wyników jako stężenia, przy którym 50 % (PC_{50}) lub 10 % (PC_{10}) wartości kontroli dodatniej jest osiągane w odniesieniu do testu agonisty, a 50 % (IC_{50}) lub 30 % (IC_{30}) wzbogaconej wartości kontrolnej jest hamowane w odniesieniu testu antagonistycznego, osiąga oba te cele. Badana substancja chemiczna jest jednak uważana za dodatnią, jeżeli maksymalna reakcja wywołana przez badaną substancję chemiczną (RPC_{Max}) jest równa lub przekracza 10 % reakcji kontroli dodatniej w co najmniej dwóch z dwóch lub dwóch z trzech serii badawczych, natomiast badana substancja chemiczna jest uważana za ujemną, jeżeli RPC_{Max} nie osiągnie co najmniej 10 % reakcji kontroli dodatniej w dwóch z dwóch lub dwóch z trzech serii badawczych.

44. Obliczeń PC10, PC5 i PCMaks w teście agonisty receptora estrogenowego oraz IC30 i IC50 w teście antagonisty receptora estrogenowego można dokonać, wykorzystując arkusz kalkulacyjny, który jest dostępny na publicznej stronie internetowej OECD poświęconej wytycznym dotyczącym badań ([1]).

45. Co najmniej podwójne uzyskanie wartości PC10 lub PC50 i IC30 lub IC50 powinno wystarczyć. Jeżeli jednak wynikająca z tego linia podstawowa dotycząca danych będących w tym samym zakresie stężeń wykaże zmienność z niedopuszczalnie wysokim współczynnikiem zmienności (CV; %), dane te mogą zostać uznane za niewiarygodne i w takim wypadku należy określić źródło wysokiej zmienności. CV potrójnych danych surowych (tj. danych dotyczących intensywności luminescencji) punktów danych wykorzystywanych do obliczenia PC10 powinno wynosić mniej niż 20 %.

46. Spełnienie kryteriów dopuszczalności wskazuje, że system testów funkcjonuje prawidłowo, ale nie gwarantuje, że którakolwiek konkretna seria badawcza dostarczy dokładnych danych. Powielenie wyników pierwszej serii badawczej gwarantuje największe prawdopodobieństwo uzyskania dokładnych danych.

47. W przypadku testu agonisty receptora estrogenowego tam, gdzie istnieje potrzeba uzyskania dodatkowych informacji w celach rozpoznania i ustalenia priorytetów niniejszej wytycznej dotyczącej badań w odniesieniu do badanych substancji chemicznych, a zwłaszcza substancji chemicznych PC10–PC49, jak również substancji chemicznych podejrzewanych o nadmierną stymulację lucyferazy, można potwierdzić, że jej obserwowana aktywność jest wyłącznie reakcją szczególną dla receptora estrogenowego alfa, przy wykorzystaniu antagonisty receptora estrogenowego alfa (zob. dodatek 2.1).

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

48. Zob. pkt 20 dotyczący „ELEMENTÓW BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2015). *Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity.* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 225. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(2) Escande A., *et al.* (2006). *Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta*. „Biochem. Pharmacol.” nr 71, s. 1459–1469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). *Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta.* „Endocrinol.” nr 139, s. 4252–4263.

([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." nr 78(1), s. 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." nr 57(4), s. 769–771.

(6) Dussurget O. i Roulland-Dussoix D. (1994). *Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera.* „Appl. Environ. Microbiol." nr 60(3), s. 953–959.

(7) De Lean A., Munson P.J. i Rodbard D. (1978). *Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves.* „Am. J. of Physiol." nr 235, E97–El02.

▼M8

Dodatek 2.1

WYNIKI FAŁSZYWIE DODATNIE: OCENA SYGNAŁÓW LUMINESCENCJI NIEPRZEKAZYWANYCH ZA POMOCĄ RECEPTORA

1. Wyniki fałszywie dodatnie w badaniu antagonisty receptora estrogenowego mogą pojawiać się na skutek aktywacji genu lucyferazy niezależnej od receptora estrogenowego lub na skutek bezpośredniej aktywacji produktu genu lub niepowiązanej fluorescencji. Wyniki takie wskazuje niekompletna lub nietypowa krzywa dawka-efekt. Jeżeli podejrzewa się wystąpienie takich wyników, należy zbadać wpływ wyników antagonisty receptora estrogenowego (np. 4-hydroksytamoksyfen (OHT) w stężeniu nietoksycznym) na reakcję. Czysty antagonista ICI 182780 może być niewłaściwy do tego celu, ponieważ wystarczające stężenie ICI 182780 może obniżyć wartość VC, a to w rezultacie wpłynie na analizę danych.

2. Aby zapewnić zasadność tego podejścia, na tej samej płytce należy przeprowadzić badanie następujących elementów:

   — aktywności agonistycznej nieznanej substancji chemicznej zawierającej/niezawierającej 10 μM OHT;

   — VC (trzykrotnie);

   — OHT (trzykrotnie);

   — 1 nM E2 (trzykrotnie) jako agonisty PC;

   — 1 nM E2 + OHT (trzykrotnie).

Kryteria interpretacji danych

Uwaga: Wszystkie dołki powinny otrzymać jednakowe stężenie nośnika.

— Jeżeli aktywność agonistyczna nieznanej substancji chemicznej NIE zostanie naruszona w wyniku stosowania antagonisty receptora estrogenowego, klasyfikuje się ją jako „ujemną”.

— Jeżeli aktywność agonistyczna nieznanej substancji chemicznej jest całkowicie zablokowana, zastosowanie mają kryteria podejmowania decyzji.

— Jeżeli aktywność agonistyczna w najniższym stężeniu jest równa bądź przekracza reakcję PC10, nieznana substancja chemiczna jest blokowana w stopniu równym bądź przekraczającym reakcję PC10. Różnicę w reakcjach między dołkami poddanymi działaniu antagonisty receptora estrogenowego i dołkami niepoddanymi takiemu działaniu oblicza się i należy uznać ją za rzeczywistą reakcję oraz wykorzystać do obliczania odpowiednich parametrów umożliwiających podjęcie decyzji o klasyfikacji.

Analiza danych

Skontrolować standardy wykonywania badań.

Skontrolować CV między dołkami poddanymi działaniu substancji w takich samych warunkach.

1. Obliczyć średnią VC.

2. Odjąć średnią VC od wartości każdego dołka **niepoddanego** działaniu OHT.

3. Obliczyć średnią OHT.

4. Odjąć średnią VC od wartości każdego dołka poddanego działaniu OHT.

5. Obliczyć średnią PC.

6. Obliczyć względną aktywność transkrypcyjną wszystkich innych dołków w stosunku do PC.

▼**M8**

Dodatek 2.2

PRZYGOTOWANIE SUROWICY PODDANEJ DZIAŁANIU WĘGLA DRZEWNEGO POKRYTEGO DEKSTRANEM

1. Poddawanie surowicy działaniu węgla drzewnego pokrytego dekstranem stanowi ogólną metodę usuwania związków estrogenowych z surowicy, którą dodaje się do podłoża komórkowego w celu wykluczenia subiektywnej reakcji związanej z pozostałościami estrogenów w surowicy. W trakcie tej procedury działaniu można poddać 500 ml bydlęcej surowicy płodowej.

Komponenty

2. Wymagane będą następujące materiały i sprzęt:

Materiały

aktywowany węgiel drzewny;

dekstran;

sześciowodny chlorek magnezu ($MgCl_2$ $6H_2O$);

sacharoza;

1 M roztworu buforowego KEPES (pH 7,4);

woda ultraczysta uzyskana za pomocą systemu filtracyjnego.

Sprzęt

Wysterylizowany w autoklawie szklany pojemnik (rozmiar należy odpowiednio dostosować) Standardowa wirówka laboratoryjna (której temperaturę można ustawić na 4 °C).

Procedura

3. Niniejszą procedurę dostosowano do wykorzystania probówek wirówkowych o pojemności 50 ml:

[Dzień 1] Należy przygotować zawiesinę węgla drzewnego pokrytego dekstranem z 1 l wody ultraczystej zawierającej 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M sacharozy, 2,5 g węgla drzewnego, 0,25 g dekstranu i 5 mM HEPES i mieszać nocą w temperaturze 4 °C.

[Dzień 2] Rozmieścić zawiesinę w probówkach wirówki o pojemności 50 ml i wirować przez 10 min z prędkością 10 000 obr./min w temperaturze 4 °C. Usunąć supernatant, a połowę osadu z węgla drzewnego przechowywać w temperaturze 4 °C do wykorzystania w 3. dniu. Pozostałą część węgla drzewnego zawiesić za pomocą bydlęcej surowicy płodowej, którą należy uprzednio ostrożnie rozmrozić, by uniknąć strącenia i przez 30 min inaktywować ciepłem w temperaturze 56 °C, a następnie umieścić w wysterylizowanym w autoklawie szklanym pojemniku (np. w kolbie Erlenmeyera). Zawiesinę mieszać ostrożnie nocą w temperaturze 4 °C.

[Dzień 3] Rozmieścić zawiesinę zawierającą bydlęcą surowicę płodową w probówkach wirówki do wirowania przez 10 min z prędkością 10 000 obr./min w temperaturze 4 °C. Zebrać bydlęcą surowicę płodową i przenieść ją do nowego osadu z węgla drzewnego przygotowanego i przechowywanego od 2. dnia. Zawiesić osad z węgla drzewnego i nocą ostrożnie mieszać tę zawiesinę w wysterylizowanym w autoklawie szklanym pojemniku w temperaturze 4 °C.

[Dzień 4] Rozmieścić zawiesinę w probówkach wirówki do wirowania przez 10 min z prędkością 10 000 obr./min w temperaturze 4 °C oraz sterylizować supernatant poprzez filtrację sterylnym filtrem 0,2 μm. Ten węgiel drzewny pokryty dekstranem poddany działaniu bydlęcej surowicy płodowej należy przechowywać w temperaturze –20 °C i można go wykorzystywać przez rok.

▼**M8**

Dodatek 3

TEST TRANSAKTYWACJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO VM7LUC DOTYCZĄCE IDENTYFIKACJI AGONISTÓW I ANTAGONISTÓW RECEPTORA ESTROGENOWEGO

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)

1. W tym teście stosuje się linię komórkową VM7Luc4E2 ([1]). Badanie to zostało zatwierdzone przez Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych oraz Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (1). Linie komórkowe VM7Luc ulegają ekspresji głównie endogennego receptor estrogenowego alfa i niewielkiej ilości endogennego receptora estrogenowego beta (2)(3)(4).

2. Test ten ma zastosowanie w odniesieniu do szerokiego zakresu substancji pod warunkiem, że można je rozpuścić w sulfotlenku dimetylu (nr CAS 67-68-5), nie wchodzą w reakcję z nim lub podłożem do hodowli komórkowej, a także nie są cytotoksyczne w badanych stężeniach. Jeżeli zastosowanie sulfotlenku dimetylowego nie jest możliwe, można zastosować inny nośnik, np. etanol lub wodę (zob. pkt 12). Wykazana efektywność badania (ant)agonisty transaktywacji receptora estrogenowego VM7Luc wskazuje, że dane wygenerowane za pomocą tego testu mogą być źródłem informacji o mechanizmach działania pośredniczących w funkcjonowaniu receptorów estrogenowych i mogą być brane pod uwagę w momencie ustalania priorytetów dla substancji w celu przeprowadzenia dalszych badań.

3. Szczególnym przeznaczeniem tego testu jest wykrywanie transaktywacji zależnej od ludzkiego receptora estrogenowego alfa i ludzkiego receptora estrogenowego beta poprzez pomiar chemiluminescencji jako punktu końcowego.α Wykorzystanie chemiluminescencji w testach biologicznych jest powszechne, ponieważ luminescencję cechuje wysoki stosunek sygnału do tła. Aktywność lucyferazy robaczka świętojańskiego w testach prowadzonych na komórkach może być jednak zakłócona przez substancje, które hamują wytwarzanie enzymu lucyferazy, powodując zarówno widoczną inhibicję, jak i zwiększoną luminescencję spowodowaną stabilizacją białka. Ponadto w przypadku pewnych testów genu reporterowego receptora estrogenowego opartych na lucyferazie, z powodu nadaktywacji lucyferazowego genu reporterowego zgłoszono sygnały niezwiązane z receptorami pośredniczącymi w luminescencji przy stężeniach fitoestrogenu przekraczających 1 μM (9) (11). Chociaż krzywa dawka-efekt wskazuje, że rzeczywista aktywacja systemu receptora estrogenowego występuje przy niższych stężeniach, w stabilnej transfekcji systemów badania aktywacji transkrypcji receptora estrogenowego należy ostrożnie badać ekspresję lucyferazy uzyskaną przy wysokich stężeniach fitoestrogenów lub podobnych związków chemicznych, co do których przypuszcza się, że wywołują one – podobnie jak fitoestrogeny – nadaktywację lucyferazowego genu reporterowego.

4. Przed rozpoczęciem stosowania tego testu do celów regulacyjnych należy zapoznać się z sekcjami „WPROWADZENIE OGÓLNE” oraz „ELEMENTY BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”. Definicje i skróty stosowane w niniejszej metodzie badawczej są opisane w dodatku 1.

([1]) Do czerwca 2016 r. linia ta była oznaczona jako linia komórkowa BG1Luc. Jako pierwszy komórki BG-1 opisał Geisinger *et al.* (1998) (12), po czym ich charakterystykę opracowali badacze z Narodowego Instytutu Nauk o Zdrowiu Środowiskowym (13). Stosunkowo niedawno odkryto, że istnieją dwie różne odmiany komórek BG-1 stosowanych przez badaczy – BG-1 Fr i BG-1 NIEHS. Wnikliwa analiza, w tym badanie DNA tych dwóch odmiennych linii komórkowych BG-1 przeprowadzona przez Li *et al.* (2014) (14) wykazały, że BG-1 Fr była niepowtarzalna, i że BG-1 NIEHS, tj. pierwotna linia komórkowa stosowana do opracowania badania, nie była linią komórkową ludzkiego raka jajnika BG1, lecz odmianą linii komórkowej ludzkiego raka piersi MCF7. Linia komórkowa stosowana w badaniu znana pod nazwą BG1Luc4E2 (15) będzie obecnie nosiła nazwę VM7Luc4E2 („V” = odmiana; „M7” = komórki MCF7). Analogiczny test będzie obecnie określany jako „badanie aktywacji transkrypcji receptora estrogennego VM7Luc” („test VM7Luc ER TA”). Chociaż powoduje to zmianę pochodzenia linii komórkowej, na której opiera się test, to nie ma wpływu ani na opublikowane badania walidacyjne, ani na użyteczność i stosowanie tego testu do celów rozpoznawania estrogenowych/antyestrogenowych substancji chemicznych.

▼M8

ZASADA WYKONANIA TESTU (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)

5. Celem testu jest wskazanie wiązania ligandów, a następnie przeniesienie kompleksu receptor-ligand do jądra komórkowego. W jądrze komórkowym kompleks receptor-ligand wiąże się z określonymi elementami reakcji DNA oraz transaktywuje gen reporterowy (*luc*), co skutkuje wydobywaniem się lucyferazy, a w związku z tym powstaniem emisji światła, którą można określić ilościowo za pomocą luminometru. Aktywność lucyferazy można ocenić w szybki i niedrogi sposób, wykorzystując szereg dostępnych na rynku zestawów pomiarowych. Mechanizm transaktywacji receptora estrogenowego VM7Luc wykorzystuje reagującą na receptor estrogenowy ludzką linię komórkową gruczolaka piersi VM7, którą stabilnie transfekuje się za pomocą reportera *luc* robaczka świętojańskiego pod kontrolą czterech elementów reakcji estrogenowej umieszczonych powyżej promotora wirusa mysiego nowotworu gruczołu piersiowego, aby wykryć substancje wykazujące aktywność agonistów lub antagonistów receptora estrogenowego *in vitro*. Ten promotor mysiego nowotworu gruczołu piersiowego okazuje jedynie niewielką reakcję krzyżową z innymi hormonami sterydowymi i niesterydowymi (8). Kryteria dotyczące interpretacji danych szczegółowo opisano w pkt 41. Krótko mówiąc, reakcję dodatnią stwierdza się na podstawie krzywej zależności stężenie-odpowiedź, składającej się z co najmniej trzech punktów z nienakładającymi się na siebie słupkami błędu (średnim ±SD), jak również na podstawie zmiany amplitudy (ujednoliconych względnych jednostek światła) o co najmniej 20 % maksymalnej wartości dla wzorca referencyjnego (17β-estradiol [E2; nr CAS 50-28-2] w odniesieniu do testu agonisty, raloksyfen HCl [Ral; nr CAS 84449-90-1]/E2 w odniesieniu do testu antagonisty).

PROCEDURA

Linia komórkowa

6. W teście należy stosować stabilnie transfekowaną linię komórkową VM7Luc4E2. Dana linia komórkowa jest dostępna jedynie na podstawie technicznej umowy licencyjnej pochodzącej z Uniwersytetu Kalifornijskiego, Davis, Kalifornia, Stany Zjednoczone ([1]) oraz z Xenobiotic Detection Systems Inc., Durnham, Północna Karolina, Stany Zjednoczone ([2]).

Stabilność linii komórkowej

7. Aby zachować stabilność i integralność linii komórkowej, komórki powinny wyrastać z zamrożonego zapasu w pożywkach utrzymujących przez więcej niż jeden pasaż (zob. pkt 9). Komórek nie powinno się hodować przez więcej niż 30 pasaży. W przypadku linii komórkowej VM7Luc4E2, 30 pasaży może trwać około trzy miesiące.

Kultura komórkowa i warunki posiewu

8. Należy przestrzegać procedur określonych w wytycznej dotyczącej dobrych praktyk w zakresie kultury komórkowej (5) (6), aby zagwarantować wysoką jakość wszystkich materiałów i metod, co pozwoli zachować integralność, zasadność i odtwarzalność wszelkich prowadzonych prac.

9. Komórki VM7Luc4E2 zachowuje się w pożywce RPMI 1640 zawierającej 0,9 % Pen-Strep i 8,0 % bydlęcej surowicy płodowej w dedykowanym inkubatorze do hodowli tkankowej w temperaturze 37 ^{o}C ±1 ^{o}C, wilgotności 90 % ±5 % i atmosferze zawierającej 5,0 % ±1 % CO_2.

10. Do chwili osiągnięcia konfluencji na poziomie około 80 %, komórki VM7Luc4E2 wysiewa się na hodowle wtórne i kondycjonuje do środowiska wolnego od estrogenów przez 48 godzin przed posianiem komórek w 96-dołkowych płytkach w celu poddania ich działaniu badanych substancji chemicznych i analizy zależnej od estrogenów indukcji

([1]) Dr Michael S. Denison. Profesor, Wydział Toksykologii Środowiskowej, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, Uniwersytet Kalifornijski, Davis, Karolina, 95616, e-mail: msdenison@ucdavis.edu, +1 5307548649

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc., 1601 East Geer Street, Suite S, Durham, Karolina Północna, 27704 Stany Zjednoczone, e-mail: info@dioxins.com, Telefon: +1 9196884804, Faks: +1 9196884404

▼M8

aktywności lucyferazy. Pożywka wolna od estrogenów zawiera Dulbecco's Modification of Eagle's Medium uzupełniony 4,5 % bydlęcą surowicą płodową pozbawioną czerwieni fenolowej i poddaną działaniu węgla drzewnego / dekstranu, 1,9 % L-glutaminą i 0,9 % Pen-Strep. Wszystkie wyroby z tworzyw sztucznych powinny być wolne od aktywności estrogenowej [zob. protokół szczegółowy (7)].

Kryteria dopuszczalności

11. Akceptacji lub odrzucenia badania dokonuje się na podstawie oceny wyników kontroli i wzorca referencyjnego uzyskanych z każdego doświadczenia przeprowadzonego na 96-dołkowej płytce. Każdy wzorzec referencyjny bada się w wielu stężeniach i istnieje wiele próbek każdego stężenia referencyjnego i stężenia kontroli. Wyniki porównuje się do wyników kontroli jakości pod względem tych parametrów, które pochodziły z bazy danych historycznych agonistów i antagonistów wygenerowanych przez każde laboratorium podczas wykazywania efektywności. Bazy danych historycznych ciągle aktualizuje się o wartości wzorców referencyjnych i kontroli. Zmiany w sprzęcie lub warunkach laboratoryjnych mogą wymagać wygenerowania zaktualizowanych baz danych historycznych.

Badanie agonisty

Badanie ustalające zakres dawkowania

- indukcja: Indukcję płytki należy mierzyć, dzieląc najwyższą średnią wartość względnej jednostki światła wzorca referencyjnego E2 przez średnią wartość względnej jednostki światła kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym. Zazwyczaj osiąga się pięciokrotność indukcji, jednak dla celów dopuszczalności krotność indukcji powinna być większa bądź równa 4.

- wyniki kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym: Wartości względnej jednostki światła kontroli z rozpuszczalnikiem powinny mieścić się w granicach 2,5-krotności odchylenia standardowego historycznej średniej wartości względnej jednostki światła kontroli z rozpuszczalnikiem.

- doświadczenie, które nie spełni któregokolwiek z kryteriów dopuszczalności należy odrzucić i powtórzyć.

Badanie kompleksowe

W jego skład wchodzą kryteria dopuszczalności pochodzące z badania ustalającego zakres dawkowania oraz następujące elementy:

- wyniki wzorca referencyjnego: Krzywa zależności stężenie-odpowiedź wzorca referencyjnego E2 powinna mieć kształt sigmoidalny, a w liniowej części zawierać co najmniej trzy wartości.

- wyniki kontroli dodatniej: Wartości względnej jednostki światła kontroli z metoksychlorem powinny być wyższe niż średnia sulfotlenku dimetylowego powiększona o trzykrotność odchylenia standardowego ze średniej sulfotlenku dimetylowego.

- doświadczenie, które nie spełni któregokolwiek z kryteriów dopuszczalności należy odrzucić i powtórzyć.

Badanie antagonisty

Badanie ustalające zakres dawkowania

- redukcja: redukcję płytki mierzy się, dzieląc najwyższą średnią wartość względnej jednostki światła wzorca referencyjnego Ral/E2 przez średnią wartość względnej jednostki światła kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym. Zazwyczaj osiąga się pięciokrotność redukcji, jednak dla celów dopuszczalności krotność redukcji powinna być większa bądź równa 3.

- wyniki kontroli z E2: wartości względnej jednostki światła kontroli z E2 powinny mieścić się w granicach 2,5-krotności odchylenia standardowego historycznej średniej wartości względnej jednostki światła kontroli z E2.

▼M8

- wyniki kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym: wartości względnej jednostki światła kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym powinny mieścić się w granicach 2,5-krotności odchylenia standardowego historycznej średniej wartości względnej jednostki światła kontroli z rozpuszczalnikiem.

- Doświadczenie, które nie spełni któregokolwiek z kryteriów dopuszczalności, zostanie odrzucone i powtórzone.

Badanie kompleksowe

W jego skład wchodzą kryteria dopuszczalności pochodzące z badania ustalającego zakres dawkowania oraz następujące elementy:

- wyniki wzorca referencyjnego: Krzywa zależności stężenie-odpowiedź wzorca referencyjnego Ral/E2 powinna mieć kształt sigmoidalny i zawierać co najmniej trzy wartości w swojej liniowej części.

- wyniki kontroli dodatniej: Wartości względnej jednostki światła kontroli z tamoksyfenem/E2 powinny być niższe niż średnia kontroli z E2 pomniejszona o trzykrotność odchylenia standardowego ze średniej kontroli z E2.

- Doświadczenie, które nie spełni któregokolwiek z kryteriów dopuszczalności, zostanie odrzucone i powtórzone.

Wzorce referencyjne, kontrole dodatnie i grupy kontrolne nośnika

Grupa kontrolna nośnika (testy agonistów i antagonistów)

12. Nośnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej należy zbadać jako grupę kontrolną nośnika. Nośnikiem stosowanym w trakcie walidacji badania aktywacji transkrypcji receptora estrogenowego VM7Luc był sufotlenek dimetylowy 1 % (obj./obj.) (nr CAS 67-68-5) (zob. pkt 24). Jeśli stosuje się nośnik inny niż sufotlenek dimetylowy, wszystkie wzorce referencyjne, grupy kontrolne i badane substancje chemiczne należy, jeżeli jest to stosowne, zbadać w tym samym nośniku.

Wzorzec referencyjny (agonista ustalający zakres dawkowania)

13. Wzorcem referencyjnym jest E2 (nr CAS 50-28-2). W przypadku badań ustalających zakres dawkowania, wzorzec referencyjny składa się z serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym, zawierającej cztery stężenia E2 ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ i $2{,}87 \times 10^{-12}$ M), przy czym każde z nich badane jest w zduplikowanych dołkach.

Wzorzec referencyjny (kompleksowy agonista)

14. W przypadku badań kompleksowych, E2 składa się z serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2, zawierającej w zduplikowanych dołkach 11 stężeń E2 (w zakresie od $3{,}67 \times 10^{-10}$ do $3{,}59 \times 10^{-13}$ M).

Wzorzec referencyjny (antagonista ustalający zakres dawkowania)

15. Wzorcem referencyjnym jest połączenie Ral (nr CAS 84449-90-1) i E2 (nr CAS 50-28-2). W przypadku badań ustalających zakres dawkowania, Ral/E2 składa się z serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym zawierającej w zduplikowanych dołkach trzy stężenia Ral ($3{,}06 \times 10^{-9}$, $7{,}67 \times 10^{-10}$ i $1{,}92 \times 10^{-10}$M) plus stałe stężenie ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) E2.

Wzorzec referencyjny (kompleksowy antagonista)

16. W przypadku badań kompleksowych, Ral/E2 składa się z serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2 Ral (w zakresie od $2{,}45 \times 10^{-8}$ do $9{,}57 \times 10^{-11}$M) plus stałego stężenia ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) E2 zawierającego w zduplikowanych dołkach dziewięć stężeń Ral/E2.

Słaba kontrola dodatnia (agonista)

17. Słabą kontrolą dodatnią jest $9{,}06 \times 10^{-6}$ M p,p′-metoksychlor (metoksychlor; nr CAS 72-43-5) w podłożu bez estrogenu.

▼M8

Słaba kontrola dodatnia (antagonista)

18. Słaba kontrola dodatnia składa się z tamoksyfenu (nr CAS 10540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M zawierającego 9,18 × 10^{-11} M E2 w podłożu bez estrogenu.

Kontrola z E2 (wyłącznie test antagonisty)

19. Kontrolą z E2 jest 9,18 × 10^{-11} M E2 w podłożu bez estrogenu oraz kontrola ujemna stosowana jako punkt odniesienia.

Krotność indukcji (agonista)

20. Indukcję aktywności lucyferazy wzorca referencyjnego (E2) mierzy się, dzieląc najwyższą średnią wartość względnej jednostki światła wzorca porównawczego E2 przez średnią wartość względnej jednostki światła kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym, a otrzymana krotność indukcji powinna być wyższa niż 4.

Krotność redukcji (antagonista)

21. Średnią aktywność lucyferazy wzorca referencyjnego (Ral/E2) mierzy się, dzieląc najwyższą średnią wartość względnej jednostki światła wzorca porównawczego E2 przez średnią wartość względnej jednostki światła kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym, a jej krotność powinna być wyższa niż 3.

Wykazanie biegłości laboratorium (zob. pkt 14 oraz tabela 3 i 4 w „ELEMENTACH BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO” niniejszej metody badawczej).

Nośnik

22. Badaną substancję chemiczną należy rozpuścić w nośniku, który rozpuszcza badaną substancję chemiczną i jest mieszalny z podłożem komórkowym. Odpowiednie nośniki stanowią woda, etanol (95–100 % czystości) i sufotlenek dimetylowy. Jeżeli stosuje się sulfotlenek dimetylowy, poziom nie powinien przekroczyć 1 % (obj./obj.). Dla każdego nośnika należy wykazać, że maksymalna zastosowana objętość nie wykazuje właściwości cytotoksycznych i nie ma wpływu na efektywność testu. Wzorce referencyjne i kontrole rozpuszcza się w rozpuszczalniku 100 %, a następnie rozcieńcza do właściwych stężeń w podłożu bez estrogenu.

Przygotowanie badanych substancji chemicznych

23. Badane substancje chemiczne rozpuszcza się w sulfotlenku dimetylowym 100 % (lub stosownym rozpuszczalniku), a następnie rozcieńcza do właściwych stężeń w podłożu bez estrogenu. Badane substancje chemiczne, przed rozpuszczeniem i rozcieńczeniem, należy pozostawić w spokoju aż do momentu osiągnięcia temperatury pokojowej. Do każdego doświadczenia należy przygotować świeże roztwory badanych substancji chemicznych. Roztwory nie powinny zawierać zauważalnego osadu ani nie powinny być mętne. Wzorzec referencyjny i roztwory kontrolne można przygotować w dużej ilości; ostateczny wzorzec referencyjny, rozcieńczenia kontrolne oraz badane substancje chemiczne należy jednak przygotować świeżo do każdego doświadczenia i wykorzystać w ciągu 24 godzin od przygotowania.

Rozpuszczalność i cytotoksyczność: Uwagi dotyczące ustalania zakresu dawkowania

24. Badanie ustalające zakres składa się z siedmiopunktowej podwojonej serii badawczej stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:10. Badane substancje chemiczne wstępnie bada się do maksymalnego stężenia wynoszącego 1 mg/ml (~1 mM) w przypadku badania agonisty oraz do 20 μg/ml (~10 μM) w przypadku badania antagonisty. Doświadczenia ustalające zakres dawkowania wykorzystuje się do określenia:

— początkowych stężeń badanych substancji chemicznych wykorzystywanych podczas badań kompleksowych;

— rozcieńczeń badanych substancji chemicznych (w stosunkach 1:2 lub 1:5) wykorzystywanych podczas badań kompleksowych.

▼M8

25. Ocena żywotności komórek / cytotoksyczności wchodzi w zakres protokołów dotyczących badania agonisty i antagonisty (7) oraz obejmuje badanie ustalające zakres dawkowania i badanie kompleksowe. Metoda dotycząca cytotoksyczności, którą stosowano do oceny żywotności komórek podczas walidacji transaktywacji receptora estrogenowy VM7Luc (1), była skalowaną jakościowo metodą obserwacji wzrokowej; do określenia cytotoksyczności można wykorzystać jednak metodę ilościową (zob. protokół (7)). Nie można wykorzystywać danych dotyczące stężeń badanych substancji chemicznych powodujących redukcję żywotności żywotności o ponad 20 %.

Narażenie na działanie badanej substancji chemicznej oraz organizacja płytki testowej

26. Komórki zlicza się i posiewa na 96-dołkowych płytkach z kulturą tkankową (2×10^5 komórek na dołek) w podłożu bez estrogenu, a następnie inkubuje przez 24 godziny, by umożliwić komórkom osadzenie się na płytce. Podłoże bez estrogenu usuwa się i zastępuje badanymi i porównawczymi substancjami chemicznymi w podłożu bez estrogenu, a następnie inkubuje przez 19–24 godzin. Należy zwrócić szczególną uwagę na substancje charakteryzujące się wysoką lotnością, ponieważ pobliskie dołki kontrolne mogą generować wyniki fałszywie dodatnie. W takich przypadkach zaleca się zastosowanie „uszczelniaczy płytek", które podczas badania mogą pomóc w skutecznym odizolowaniu poszczególnych dołków.

Badania ustalające zakres dawkowania

27. W badaniu ustalającym zakres dawkowania wykorzystuje się wszystkie dołki 96-dołkowej płytki, aby prowadzić badanie maksymalnie sześciu substancji chemicznych w postaci siedmiopunktowej podwojonej próby serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:10 (zob. rysunki 1 i 2).

— W badaniu ustalającym zakres dawkowania agonisty jako wzorzec referencyjny wykorzystuje się cztery podwojone stężenia E2 i cztery dołki stanowiące kontrpróbę kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym.

— W badaniu ustalającym zakres dawkowania antagonisty jako wzorzec referencyjny wykorzystuje się trzy podwojone stężenia Ral/E2 z zawartością $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2, z trzema dołkami stanowiącymi kontrpróbę kontroli z E2 i kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym.

Rysunek 1

Badanie ustalające zakres dawkowania agonisty – rozkład na 96-dołkowej płytce

	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

Skróty: E2-1 do E2-4 = stężenia wzorca referencyjnego E2 (od wysokiego do niskiego); TC1-1 do TC1-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 1 (TC1); TC2-1 do TC2-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 2 (TC2); TC3-1 do TC3-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 3 (TC3); TC4-1 do TC4-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 4 (TC4); TC5-1 do TC5-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 5 (TC5); TC6-1 do TC6-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 6 (TC6); VC = grupa kontrolna nośnika (sulfotlenek dimetylowy [1 % obj./obj. w podłożu bez estrogenu]).

▼M8

Rysunek 2

Badanie ustalające zakres dawkowania antagonisty – rozkład na 96-dołkowej płytce

	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

Skróty: E2 = kontrola z E2; Ral-1 do Ral-3 = stężenia wzorca referencyjnego raloksyfenu/E2 (od wysokiego do niskiego); TC1-1 do TC1-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 1 (TC1); TC2-1 do TC2-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 2 (TC2); TC3-1 do TC3-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 3 (TC3); TC4-1 do TC4-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 4 (TC4); TC5-1 do TC5-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 5 (TC5); TC6-1 do TC6-7 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 6 (TC6); VC = grupa kontrolna nośnika (sulfotlenek dimetylowy [1 % obj./obj. w podłożu bez estrogenu]).

Uwaga: Wszystkie badane substancje chemiczne bada się w obecności E2 9,18 × 10-11 M.

28. Zalecana ostateczna objętość podłoża wymagana dla każdego dołka wynosi 200 µl. Należy stosować jedynie płytki testowe, na których komórki we wszystkich dołkach wykazują żywotność na poziomie co najmniej 80 %.

29. Określanie początkowych stężeń w odniesieniu do kompleksowego badania **agonisty** szczegółowo opisano w protokole dotyczącym agonisty (7). Krótko mówiąc, zastosowano następujące kryteria:

— Jeżeli na krzywej przedstawiającej stężenia badanej substancji chemicznej nie istnieją punkty znajdujące się powyżej średniej powiększonej o trzykrotność odchylenia standardowego kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym, kompleksowe badanie zostanie przeprowadzone z zastosowaniem 11-punktowej serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2, począwszy od maksymalnego stężenia rozpuszczalnego.

— Jeżeli na krzywej przedstawiającej stężenia badanej substancji chemicznej istnieją punkty znajdujące się powyżej średniej powiększonej o trzykrotność odchylenia standardowego kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym, początkowe stężenie, które należy zastosować w kompleksowym badaniu w odniesieniu do 11-punktowego schematu rozcieńczeń powinno być o 1 jednostkę logarytmiczną wyższe niż stężenie dające najwyższą dostosowaną wartość względnej jednostki światła w badaniu ustalającym zakres dawkowania. 11-punktowy schemat rozcieńczeń będzie, w związku z poniższymi kryteriami oparty na rozcieńczeniach w stosunkach 1:2 albo 1:5:

11-punktową serię stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2 należy zastosować, gdy wynikły zakres stężeń obejmie pełen zakres reakcji opartych na krzywej stężenie-odpowiedź generowanych w badaniu ustalającym zakres dawkowania. W innym przypadku należy zastosować rozcieńczenie w stosunku 1:5.

▼M8

— Jeżeli badana substancja chemiczna podczas badania ustalającego zakres dawkowania wykazuje dwufazową krzywą stężenie-odpowiedź, obie fazy należy również wyjaśnić w badaniu kompleksowym.

30. Określanie początkowych stężeń w odniesieniu do kompleksowego badania **antagonisty** szczegółowo opisano w protokole dotyczącym antagonisty (7). Krótko mówiąc, zastosowano następujące kryteria:

— Jeżeli na krzywej dotyczącej stężenia badanej substancji chemicznej nie istnieją punkty znajdujące się poniżej średniej pomniejszonej o trzykrotność odchylenia standardowego kontroli z E2, kompleksowe badanie zostanie przeprowadzone z zastosowaniem 11-punktowej serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2, począwszy od maksymalnego stężenia rozpuszczalnego.

— Jeżeli na krzywej dotyczącej stężenia badanej substancji chemicznej istnieją punkty znajdujące się poniżej średniej pomniejszonej o trzykrotność odchylenia standardowego kontroli z E2, początkowe stężenie, które należy zastosować w kompleksowym badaniu w odniesieniu do 11-punktowego schematu rozcieńczeń powinno być:

• stężeniem dającym najniższą dostosowaną wartość względnej jednostki światła w badaniu ustalającym zakres dawkowania;

• najwyższym rozpuszczalnym stężeniem (zob. protokół dotyczący antagonisty (7), rysunek 14-2);

• najniższym cytotoksycznym stężeniem (dla przykładu pokrewnego zob. protokół dotyczący antagonisty (7), rysunek 14-3).

— 11-punktowy schemat rozcieńczeń będzie, w związku z poniższymi kryteriami, oparty na serii albo rozcieńczeniu w stosunku 1:2 lub 1:5:

11-punktową serię stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2 należy zastosować, gdy wynikły zakres stężeń obejmie pełen zakres reakcji opartych na krzywej stężenie-odpowiedź generowanych w badaniu ustalającym zakres dawkowania. W innym przypadku należy zastosować rozcieńczenie w stosunku 1:5.

Badania kompleksowe

31. Badanie kompleksowe składa się z 11-punktowych serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym (seriach stężeń wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:2 albo 1:5, opartych na początkowym stężeniu na podstawie kryteriów badań kompleksowych), przy czym każde stężenie bada się w trzech dołkach na 96-dołkowej płytce (zob. rysunki 3 i 4).

— W badaniu kompleksowym agonisty jako wzorzec referencyjny stosuje się 11 podwójnych stężeń E2. Na każdej płytce znajdują się cztery dołki stanowiące kontrpróbę kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym i cztery dołki stanowiące kontrpróbę kontroli z metoksychlorem ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M).

— W badaniu kompleksowym antagonisty jako wzorzec referencyjny wykorzystuje się dziewięć podwojonych stężeń Ral/E2 z zawartością $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2, przy czterech dołkach stanowiących kontrpróbę kontroli z E2 $9{,}18 \times 10^{-11}$ M, czterech dołkach stanowiących kontrpróbę kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym oraz czterech dołkach stanowiących kontrpróbę tamoksyfenu $3{,}36 \times 10^{-6}$M.

▼M8

Rysunek 3

Badanie kompleksowe agonisty – rozkład na 96-dołkowej płytce

	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

Skróty: TC1-1 do TC1-11 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 1; TC2-1 do TC2-11 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 2; E2-1 do E2-11 = stężenia wzorca referencyjnego E2 (od wysokiego do niskiego); Meth = p,p' methoksychlor, słaba kontrola dodania; VC = grupa kontrolna nośnika z sulfotlenkiem dimetylowym (1 % obj./obj.) z podłożem bez estrogenu

Rysunek 4

Badanie kompleksowe antagonisty – rozkład na 96-dołkowej płytce

	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

Skróty: E2 = kontrola z E2; Ral-1 do Ral-9 = stężenia wzorca referencyjnego raloksyfenu/E2 (od wysokiego do niskiego); Tam = tamoksyfen/E2 słaba kontrola dodatnia TC1-1 do TC1-11 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 1 (TC1); TC2-1 do TC2-11 = stężenia (od wysokiego do niskiego) badanej substancji chemicznej 2 (TC2); VC = grupa kontrolna nośnika (sulfotlenek dimetylowy [1 % obj./obj. w podłożu bez estrogenu]).Uwaga: Jak wspomniano, wszystkie dołki referencyjne i badawcze zawierają stałe stężenie E2 (9,18 x 10-11M).

32. Aby zapewnić niezależność badań kompleksowych dotyczących tej samej substancji chemicznej, ich powtórki należy przeprowadzać w różne dni. Należy przeprowadzić co najmniej dwa badania kompleksowe. Jeżeli wyniki badań są sprzeczne (np. jedno badanie jest dodatnie, a drugie ujemne), lub gdy jedno z badań jest nieodpowiednie, należy przeprowadzić trzecie, dodatkowe badanie.

Pomiar luminescencji

33. Luminescencję mierzy się w zakresie od 300 do 650 nm, wykorzystując do tego luminometr iniekcyjny i oprogramowanie kontrolujące objętość iniekcji i interwał pomiaru (7). Emisję światła z każdego dołka wyraża się jako względną jednostkę światła/dołek.

▼M8

ANALIZA DANYCH

Określenie EC_{50} /IC_{50}

34. Wartość EC_{50} (połowę maksymalnego stężenia efektywnego badanej substancji chemicznej [agonistów]) oraz wartość IC_{50} (połowę maksymalnego stężenia hamującego badanej substancji chemicznej [antagonistów]) określa się za pomocą danych dotyczących zależności stężenie-odpowiedź. W przypadku badanych substancji chemicznych, które są dodatnie w co najmniej jednym stężeniu, stężenie badanej substancji chemicznej, które wywołuje reakcję połowicznie maksymalną (IC_{50} lub EC_{50}) oblicza się, przeprowadzając analizę funkcji Hill lub jej odpowiednią alternatywy. Funkcja Hill stanowi czteroparametrowy logistyczny model matematyczny, przedstawiający stosunek stężenia badanej substancji chemicznej do reakcji (zazwyczaj w postaci krzywej sigmoidalnej), który oblicza się za pomocą następującego równania:

$$Y = Dół + \frac{(Góra - Dół)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Nachylenie}$$

gdzie:

Y = reakcja (tj. względne jednostki światła);

X = logarytm stężenia;

Dół = minimalna reakcja;

Góra = najwyższa reakcja;

lg EC_{50} (or lg IC_{50}) = logarytm z X jako pośrednia reakcja między najwyższą wartością a najniższą;

Nachylenie = stromość krzywej.

W tym modelu oblicza się najlepszą możliwość dostosowania parametrów najwyższej wartości, najniższej wartości, nachylenia oraz IC_{50} i EC_{50}. Aby obliczyć wartości EC_{50} i IC_{50}, należy skorzystać z odpowiedniego oprogramowania do obliczeń statystycznych (np. z oprogramowania do obliczeń statystycznych Graphpad Prism^{R}).

Określenie wyników odstających

35. Właściwy osąd statystyczny można by uprościć, stosując między innymi test Q (zob. protokoły dotyczące agonisty i antagonisty (7)), by określić dołki „nienadające się do wykorzystania”, które zostaną wykluczone z analizy danych).

36. W przypadku kontrprób wzorca referencyjnego E2 (przy wielkości próby wynoszącej dwie kontrpróby), każdą dostosowaną wartość względnej jednostki światła w odniesieniu do kontrpróby w danym stężeniu E2 uznaje się za odstającą, jeżeli jej wartość w bazie danych historycznych jest o 20 % wyższa lub niższa od wartości względnej jednostka światła dla tego stężenia.

Gromadzenie i dostosowywanie danych z luminometru na potrzeby badań ustalających zakres

37. Dane surowe z luminometra należy przenieść na szablon arkusza kalkulacyjnego zaprojektowanego na potrzeby danego testu. Należy ustalić, czy istnieją punkty danych odstających, które należy usunąć. (W odniesieniu do parametrów określonych w analizie zob. kryteria dopuszczalności badania.) Należy dokonać następujących obliczeń:

Agonista

Krok 1 Obliczyć średnią wartość dla grupy kontrolnej nośnika (VC) z sulfotlenkiem dimetylowym.

Krok 2 Odjąć średnią wartość sulfotlenku dimetylowego od wartości każdego dołka, aby znormalizować dane.

▼**M8**

Krok 3 Obliczyć średnią krotność indukcji w odniesieniu do wzorca referencyjnego (E2).

Krok 4 Obliczyć średnią wartość EC_{50} w odniesieniu do badanych substancji chemicznych.

Antagonista

Krok 1 Obliczyć średnią wartość dla VC sulfotlenku dimetylowego.

Krok 2 Odjąć średnią wartość sulfotlenku dimetylowego od wartości każdego dołka, aby znormalizować dane.

Krok 3 Obliczyć średnią krotność redukcji w odniesieniu do wzorca referencyjnego (Ral/E2).

Krok 4 Obliczyć średnią wartość wzorca referencyjnego E2.

Krok 5 Obliczyć średnią wartość IC50 w odniesieniu do badanych substancji chemicznych.

Gromadzenie i dostosowywanie danych z luminometru na potrzeby badań kompleksowych

38. Dane surowe z luminometra należy przenieść na szablon arkusza kalkulacyjnego zaprojektowanego na potrzeby danego testu. Należy ustalić, czy istnieją punkty danych odstających, które należy usunąć. (W odniesieniu do parametrów określonych w analizie zob. kryteria dopuszczalności badania.) Dokonuje się następujących obliczeń:

Agonista

Krok 1 Obliczyć średnią wartość dla VC sulfotlenku dimetylowego.

Krok 2 Odjąć średnią wartość sulfotlenku dimetylowego od wartości każdego dołka, aby znormalizować dane.

Krok 3 Obliczyć średnią krotność indukcji w odniesieniu do wzorca referencyjnego (E2).

Krok 4 Obliczyć średnią wartość EC_{50} w odniesieniu do E2 i badanych substancji chemicznych.

Krok 5 Obliczyć średnią dostosowaną wartość względnej jednostki światła dla metoksychloru.

Antagonista

Krok 1 Obliczyć średnią wartość dla VC sulfotlenku dimetylowego.

Krok 2 Odjąć średnią wartość sulfotlenku dimetylowego od wartości każdego dołka, aby znormalizować dane.

Krok 3 Obliczyć średnią krotność indukcji w odniesieniu do wzorca referencyjnego (Ral/E2).

Krok 4 Obliczyć średnią wartość IC_{50} w odniesieniu do Ral/E2 i badanych substancji chemicznych.

Krok 5 Obliczyć średnią dostosowaną wartość względnej jednostki światła dla tamoksyfenu.

Krok 6 Obliczyć średnią wartość wzorca referencyjnego E2.

▼M8

Kryteria interpretacji danych

39. Transaktywacja receptora estrogenowego VM7Luc ma stanowić część wagi dowodów, aby pomóc w ustaleniu priorytetów substancji do badań *in vivo* na obecność ED. Część niniejszej procedury ustalania priorytetów będzie stanowić klasyfikowanie badanej substancji chemicznej jako dodatniej lub ujemnej w odniesieniu do aktywności agonisty albo antagonisty receptora estrogenowego. W tabeli 1 przedstawiono dodatnie i ujemne kryteria podejmowania decyzji stosowane w badaniu walidacyjnym transaktywacji receptora estrogenowego VM7Luc.

Tabela 1

Dodatnie i ujemne kryteria podejmowania decyzji

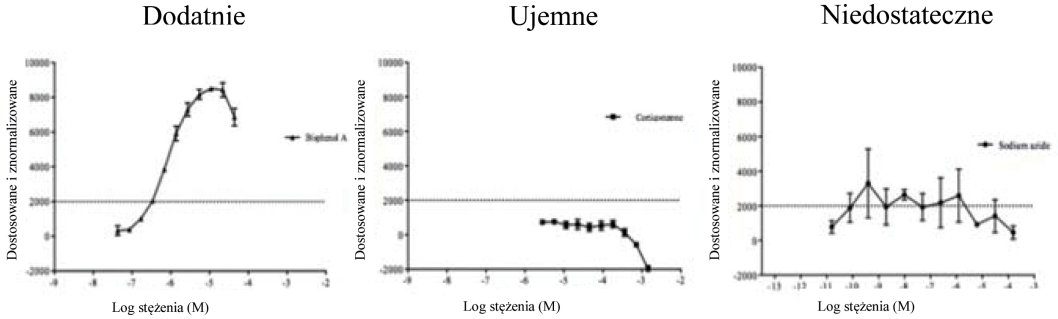
AKTYWNOŚĆ AGONISTY	
Dodatnia	— Wszystkie badane substancje chemiczne sklasyfikowane jako *dodatnie* pod względem aktywności agonisty receptora estrogenowego powinny zawierać krzywą zależności stężenie-odpowiedź, składającą się z linii podstawowej, po której następuje nachylenie dodatnie, a następnie plateau lub wierzchołek. W niektórych przypadkach można określić jedynie dwie z tych cech charakterystycznych (linia podstawowa-nachylenie lub nachylenie-wierzchołek). — Linia określająca nachylenie dodatnie powinna składać się z co najmniej trzech punktów zawierających nienakładające się na siebie słupki błędu (średnia ±SD). Nie uwzględnia się punktów formujących linię podstawową, jednak liniowa część krzywej może zawierać wierzchołek lub pierwszy punkt plateau. — W przypadku dodatniej klasyfikacji wymaga się wskazania amplitudy reakcji – różnicy między linią podstawową a wierzchołkiem przy maksymalnej wartości wzorca referencyjnego (E2) wynoszącej co najmniej 20 % (tj. co najmniej 2 000 względnych jednostek światła, podczas gdy maksymalną wartość reakcji wzorców referencyjnych [E2] dostosowano do wartości 10 000 względnych jednostek światła). — Jeżeli jest to możliwe, wartość EC_{50} należy obliczyć w odniesieniu do każdej dodatniej substancji chemicznej.
Ujemna	Średnia dostosowana wartość względnej jednostki światła w odniesieniu do danego stężenia jest równa lub niższa od średniej wartości względnej jednostki światła kontroli z sulfotlenkiem dimetylowym plus trzykrotności odchylenia standardowego względnej jednostki światła sulfotlenku dimetylowego.
Niedostateczna	Dane, których nie można interpretować jako prawidłowe pod kątem obecności albo nieobecności aktywności substancji z uwagi na znaczne ograniczenia jakościowe lub ilościowe uznaje się za niedostateczne oraz niezdatne do wykorzystania przy określaniu, czy badana substancja chemiczna jest dodatnia czy ujemna. Badanie substancji chemicznych należy przeprowadzić ponownie.
AKTYWNOŚĆ ANTAGONISTY	
Dodatnia	— Dane dotyczące badanej substancji chemicznej kreślą krzywą zależności stężenie-odpowiedź, składającą się z linii podstawowej, po której następuje nachylenie ujemne. — Linia określająca nachylenie ujemne powinna składać się z co najmniej trzech punktów zawierających nienakładające się na siebie słupki błędu; nie wyklucza się punktów formujących linię podstawową, jednak liniowa część krzywej może zawierać pierwszy punkt plateau. — W przypadku wzorca referencyjnego (Ral/E2) powinno zaistnieć zmniejszenie aktywności o co najmniej 20 % w stosunku do wartości maksymalnej (tj. co najwyżej 8 000 względnych jednostek światła, podczas gdy maksymalną wartość reakcji wzorca referencyjnego [Ral/E2] dostosowano do wartości 10 000 względnych jednostek światła). — Najwyższe niecytotoksyczne stężenia badanej substancji chemicznej powinny być mniejsze bądź równe $1x10^{-5}$ M. — Jeżeli jest to możliwe, wartość IC_{50} należy obliczyć w odniesieniu do każdej dodatniej badanej substancji chemicznej.
Ujemna	Wszystkie punkty danych znajdują się powyżej wartości EC_{80} (80 % reakcji E2 lub 8 000 względnych jednostek światła), w stężeniach poniżej $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Niedostateczna	Dane, których nie można interpretować jako prawidłowe pod kątem obecności albo nieobecności aktywności substancji z uwagi na znaczne ograniczenia jakościowe lub ilościowe uznaje się za niedostateczne oraz niezdatne do wykorzystania przy określaniu, czy badana substancja chemiczna jest dodatnia czy ujemna. Badanie substancji chemicznej należy przeprowadzić ponownie.

▼M8

40. Wyniki dodatnie będą charakteryzować się zarówno wielkością skutku, oraz ilekroć to możliwe – stężeniem, przy którym występuje skutek. Przykłady dodatnich, ujemnych oraz niedostatecznych danych przedstawiono na rysunkach 5 i 6.

Rysunek 5

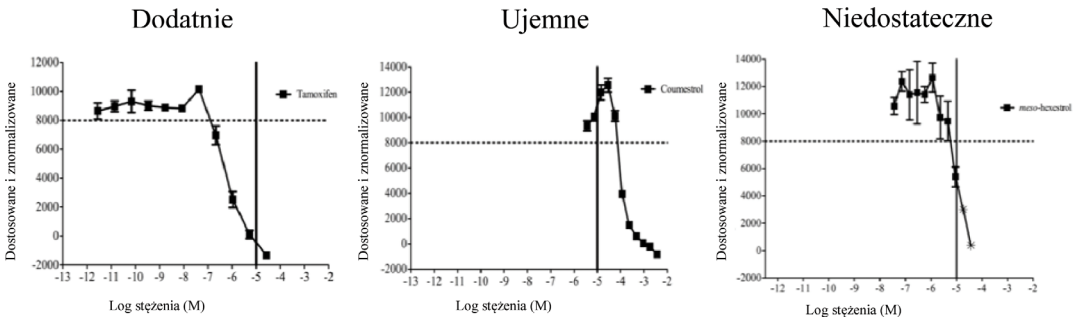
Przykłady agonistów: dane dodatnie, ujemne lub niedostateczne



Linią przerywaną oznaczono poziom 20 % reakcji E2, czyli 2 000 dostosowanych i znormalizowanych względnych jednostek światła.

Rysunek 6

Przykłady antagonistów: dane dodatnie, ujemne lub niedostateczne



Linią przerywaną oznaczono poziom 80 % reakcji Ral/E2, czyli 8 000 dostosowanych i znormalizowanych względnych jednostek światła.

Linią ciągłą oznaczono 1,00 × 10^{-5} M. W przypadku reakcji, którą zamierza się uznać za dodatnią, liczba względnych jednostek światła nie powinna przekraczać poziomu 8 000, a jej stężenia – 1,00 × 10–5 M.

Stężenia oznaczone gwiazdką na wykresie mezoheksestrolu wskazują na wyniki żywotności „2” lub większe.

Wyniki badania mezoheksestrolu uważa się za dane nieodpowiednie, ponieważ jedyna reakcja, która jest niższa niż 8 000 RLU zachodzi przy 1,00 × 10–5 M.

41. Obliczeń EC_{50} i IC_{50} można dokonać, wykorzystując czteroparametrową funkcję Hill (w celu uzyskania bardziej szczegółowych informacji zob. protokoły dotyczące agonistów i antagonistów (7)). Spełnienie kryteriów dopuszczalności wskazuje, że system działa prawidłowo, ale nie gwarantuje, że którakolwiek konkretna seria badawcza dostarczy dokładnych danych. Powielenie wyników pierwszej serii badawczej gwarantuje największe prawdopodobieństwo uzyskania dokładnych danych (zob. pkt 19 dotyczący „ELEMENTÓW BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”).

▼**M8**

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

42. Zob. pkt 20 dotyczący „ELEMENTÓW BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”.

BIBLIOGRAFIA

(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” nr 23 (wyd. uzupełnione), s. 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” nr 33, s. 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” nr 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.” nr 13(1) s. 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.” nr 71(10), s. 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” nr 17(6), s. 646–57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. „Endocrinology” nr 139(10), s. 4252–63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). *Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors*, „Cancer” nr 63, s. 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” nr 34, s. 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.” nr 28, s. 2072–2081.

(15) Rogers, J.M. i 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.” nr 13, s. 67–82.

▼**M8**

Dodatek 4

TEST TRANSAKTYWACJI STABILNIE TRANSFEKOWANEGO LUDZKIEGO RECEPTORA ESTROGENOWEGO W CELU WYKRYCIA ESTROGENOWEGO DZIAŁANIA AGONISTYCZNEGO I ANTAGONISTYCZNEGO SUBSTANCJI CHEMICZNYCH Z WYKORZYSTANIEM LINII KOMÓRKOWEJ Z EKSPRESJĄ AKTYWOWANYCH CHEMICZNIE GENÓW LUCYFERAZY RECEPTORA ESTROGENOWEGO ALFA

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)

1. Do celów wykrywania estrogenowej aktywności agonistycznej i antagonistycznej przekazywanej przez ludzki receptor estrogenowy alfa (hERα), w teście transaktywacji ekspresji aktywowanych chemicznie genów lucyferazy receptora estrogenowego alfa wykorzystuje się ludzką linię komórkową U2OS. Badanie walidacyjne stabilnie transfekowanego testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa przeprowadzone przez BioDetection Systems BV (Amsterdam, Niderlandy) wykazało stosowność i wiarygodność badania w odniesieniu do jego zamierzonego celu (1). W linii komórkowej z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy receptora estrogenowego alfa zachodzi ekspresja jedynie stabilnie transfekowanego ludzkiego receptora estrogenowego alfa (2)(3).

2. Szczególnym przeznaczeniem tego testu jest wykrywanie transaktywacji zależnej od ludzkiego receptora estrogenowego alfa poprzez pomiar bioluminescencji jako punktu końcowego. Bioluminescencja, ze względu na wysoki stosunek sygnału do szumu (4), jest powszechnie stosowana w testach biologicznych.

3. Stwierdzono, że stężenia fitoestrogenu wyższe niż 1 μM powodują nadmierną aktywację genu reporterowego lucyferazy, w wyniku czego powstaje luminescencja niezależna od receptora (5)(6)(7). W związku z tym wyższe stężenia fitoestrogenów lub podobnych związków mogących powodować nadmierną aktywację ekspresji lucyferazy należy dokładnie zbadać w trakcie stabilnie transfekowanych testów transaktywacji receptora estrogenowego (zob. dodatek 2).

4. Przed rozpoczęciem stosowania tego testu do celów regulacyjnych należy zapoznać się z sekcjami „WPROWADZENIE OGÓLNE” oraz „ELEMENTY BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”. Definicje i skróty stosowane w niniejszej metodzie badawczej opisano w dodatku 1.

ZASADA WYKONANIA TESTU (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)

5. Celem testu biologicznego jest ocena wiązania ligandów receptora estrogenowego, a następnie przeniesienie kompleksu receptor-ligand do jądra komórkowego. W jądrze komórkowym kompleks receptor-ligand wiąże określone elementy odpowiedzi DNA i transaktywuje gen reporterowy lucyferazy robaczka świętojańskiego, powodując zwiększoną ekspresję komórkową enzymu lucyferazy. Po dodaniu lucyferazy jako substratu lucyferyny, lucyferyna przekształca się w produkt bioluminescencyjny. Wytworzone światło można w łatwy sposób wykryć i za pomocą luminometru określić ilościowo.

6. W układzie badawczym wykorzystuje się stabilnie transfekowane komórki ekspresji aktywowanych chemicznie genów lucyferazy receptora estrogenowego alfa. Komórki ekspresji aktywowanych chemicznie genów lucyferazy pochodzą z ludzkiej osteoblastycznej linii komórkowej kostniakomięsaka o nazwie U2OS. Ludzkie komórki U2OS stabilnie transfekowano z 3xHRE-TATA-Luc i pSG5-neo-hERα metodą współstrącania fosforanu wapnia. Linię komórkową U2OS wybrano ze względu na najwyższą odpowiedniość do pełnienia roli wskaźnikowej linii komórkowej reagującej na estrogeny (oraz inne hormony steroidowe), opierając się na obserwacji, że linia komórkowa U2OS wykazywała niewielką lub zerową aktywność receptora endogennego. Nieobecność receptorów endogennych oceniono, korzystając jedynie z plazmidów reporterowych lucyferazy, nie wykazujących aktywności po dodaniu ligandów receptorowych. Ponadto ta linia komórkowa, w momencie przejściowego wprowadzenia receptorów poznawczych stanowiła wsparcie dla reakcji zależnych od silnych hormonów (2)(3)(8).

7. Badanie substancji chemicznych pod kątem aktywności estrogenowej lub antyestrogenowej przy zastosowaniu linii komórkowej z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy receptora estrogenowego alfa obejmuje wstępną serię badawczą i kompleksowe serie badawcze. We wstępnej serii badawczej określa się rozpuszczalność, cytotoksyczność oraz zawężony zakres stężeń badanych substancji

▼M8

chemicznych, które służą do wykonania kompleksowych serii badawczych. W kompleksowych seriach badawczych w ramach testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa przeprowadza się badanie zawężonych zakresów stężeń badanych substancji chemicznych, a następnie badane substancje chemiczne klasyfikuje się pod kątem agonizmu lub antagonizmu.

8. Kryteria dotyczące interpretacji danych opisano szczegółowo w pkt 59. Krótko mówiąc, badaną substancję chemiczną uznaje się za dodatnią pod kątem agonizmu w przypadku, gdy co najmniej dwa następujące po sobie stężenia badanej substancji chemicznej wykazują reakcję, która jest wyższa bądź równa 10 % maksymalnej reakcji wzorca referencyjnego 17β-estradiolu (PC_{10}). Badaną substancję chemiczną uznaje się za dodatnią pod kątem antagonizmu, w przypadku gdy co najmniej dwa następujące po sobie stężenia badanej substancji chemicznej wykazują reakcję, która jest niższa bądź równa 80 % maksymalnej reakcji wzorca referencyjnego tamoksyfenu (PC_{80}).

PROCEDURA

Linie komórkowe

9. W teście należy stosować stabilnie transfekowaną linię komórkową U2OS z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy receptora estrogenowego alfa. Linię komórkową można pozyskać z BioDetection Systems BV (Amsterdam, Niderlandy) na podstawie technicznej umowy licencyjnej.

10. Należy stosować jedynie komórki wolne od mykoplazmy. Partie komórkowe wykorzystane do badań powinny albo dawać wyniki ujemne pod względem zanieczyszczenia mykoplazmą, albo przed ich zastosowaniem powinno się wykonać badanie na obecność mykoplazmy. RT-PCR (reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym) należy zastosować w odniesieniu do czułego wykrywania zakażenia mykoplazmą (9).

Stabilność linii komórkowej

11. Aby zachować stabilność i integralność komórek ekspresji aktywowanych chemicznie genów lucyferazy, należy przechowywać je w ciekłym azocie (w temperaturze -80 °C). Po rozmrożeniu komórek w celu rozpoczęcia nowej hodowli, komórki, zanim rozpocznie się ich stosowanie do oceny agonistycznej i antagonistycznej aktywności substancji chemicznych, należy co najmniej dwukrotnie wysiać na hodowle wtórne. Komórki nie powinny wydzielać kultury pochodnej przez więcej niż 30 pasaży.

12. Aby monitorować stabilność linii komórkowej w czasie, należy zweryfikować antagonistyczną i agonistyczną responsywność układu badawczego, czego można dokonać, przeprowadzając ocenę wartości EC_{50} lub IC_{50} wzorca referencyjnego. Ponadto należy monitorować indukcję względną próbki kontroli dodatniej (PC) i próbki kontroli ujemnej (NC). Wyniki powinny być zgodne z kryteriami dopuszczalności dotyczącymi agonistycznego (tabela 3C) lub antagonistycznego (tabela 4C) testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa. W tabeli 1 (dla trybu agonistycznego) i 2 (dla trybu antagonistycznego) przedstawiono wzorce referencyjne, kontrole dodatnie i ujemne.

Kultura komórkowa i warunki posiewu

13. Komórki U2OS należy hodować w substancji biogennej (pożywce DMEM/F12 (1:1) zawierającej czerwony fenol pełniący rolę wskaźnika pH, uzupełnionej bydlęcą surowicą płodową (7,5 %), nieegzogennymi aminokwasami (1 %), 10 jednostkami/ml penicyliny oraz markerem selekcyjnym w postaci streptomycyny i genotycyny (G418)). Komórki należy umieścić w inkubatorze CO_2 (w atmosferze zawierającej 5 % CO_2) w temperaturze 37 °C, przy 100 % wilgotności. Kiedy komórki osiągną 85–95 % konfluencji, należy wysiać je na hodowle wtórne albo przygotować do posiania w płytkach 96-dołkowych. W drugim przypadku komórki należy zawiesić ponownie w $1x10^5$ komórek/ml w pożywce testowej wolnej od estrogenu (pożywce DMEM/F12 (1:1) niezawierającej czerwonego fenolu, uzupełnionej pokrytą dekstranem bydlęcą surowicą płodową poddaną działaniu węgla drzewnego (5 % obj./obj.), nieegzogennymi aminokwasami (1 % obj./obj.), 10 jednostkami/ml penicyliny i streptomycyny) oraz rozmieścić je w dołkach płytek 96-dołkowych (100 µl homogenizowanej zawiesiny komórki). 24 godziny przed rozpoczęciem narażania komórki należy poddać wstępnej inkubacji w inkubatorze CO_2 (w atmosferze zawierającej 5 % CO_2, w 37 °C, przy 100 % wilgotności). Wyroby wykonane z tworzywa sztucznego powinny być wolne od estrogenu.

▼M8

Kryteria dopuszczalności

14. Działania agonistyczne i antagonistyczne badanej substancji chemicznej lub badanych substancji chemicznych bada się w serii badań. Badanie składa się z maksymalnie sześciu mikropłytek. W skład każdej serii badań wchodzi co najmniej jedna seria rozcieńczeń wzorca referencyjnego, próbka kontroli dodatniej, próbka kontroli ujemnej oraz kontrole z rozpuszczalnikiem. Na rysunkach 1 i 2 przedstawiono układ płytek na potrzeby serii badań agonistycznych i antagonistycznych.

15. Każde rozcieńczenie wzorców referencyjnych, badanych substancji chemicznych, wszystkich kontroli z rozpuszczalnikiem oraz kontroli dodatnich i ujemnych należy trzykrotnie przeanalizować. Każda z tych analiz powinna spełniać wymagania określone w tabeli 3A i tabeli 4A.

16. Pomiar pełnej serii rozcieńczeń wzorca referencyjnego (w przypadku agonizmu – 17β-estradiolu; w przypadku antagonizmu – tamoksyfenu) przeprowadza się na pierwszej płytce podczas każdej serii badań. Aby umożliwić zestawienie wyników analizy pozostałych pięciu mikropłytek z pierwszą mikropłytką obejmującą pełną krzywą zależności stężenie-odpowiedź wzorca referencyjnego, wszystkie płytki powinny zawierać trzy próbki kontrolne: kontrolę z rozpuszczalnikiem, najwyższe stężenie badanego wzorca porównawczego oraz przybliżone stężenie EC_{50} (w przypadku agonizmu) lub IC_{50} (w przypadku antagonizmu) wzorca referencyjnego. Stosunek średnich próbek kontrolnych na pierwszej płytce do pozostałych pięciu płytek powinien spełniać warunki określone w tabeli 3C (agonizm) lub 4C (antagonizm).

17. Wskaźnik „z” oblicza się dla każdej z mikropłytek objętych serią badań (10). Wskaźnik „z” należy obliczyć, korzystając z reakcji w najwyższym i najniższym stężeniu wzorca referencyjnego. Mikropłytkę uznaje się za prawidłową, gdy spełnia wymagania określone w tabeli 3C (agonizm) lub 4C (antagonizm).

18. Wzorzec referencyjny powinien wykazać sygmoidalną krzywą zależności dawka-efekt. Wartości EC_{50} lub IC_{50} uzyskane z reakcji serii rozcieńczeń wzorca referencyjnego powinny spełniać wymagania określone w tabeli 3C (agonizm) lub 4C (antagonizm).

19. W skład każdej serii badań powinna wchodzić próbka kontroli dodatniej i próbka kontroli ujemnej. Obliczona względna indukcja zarówno próbki kontroli dodatniej, jak i ujemnej powinna spełniać minimalne wymagania określone w tabeli 3C (agonizm) lub 4C (antagonizm).

20. Podczas wszystkich obliczeń współczynnik sygnału najwyższego stężenia wzorca referencyjnego należy mierzyć, dzieląc średnią najwyższą reakcję względnej jednostki światła wzorca referencyjnego 17β-estradiolu przez średnią reakcję względnej jednostki światła kontroli z rozpuszczalnikiem referencyjnym. Ten współczynnik sygnału powinien spełniać minimalne wymagania krotności indukcji określone w tabeli 3C (agonizm) lub 4C (antagonizm).

21. Wyłącznie mikropłytki, które spełniają wszystkie wymienione powyżej kryteria dopuszczalności uznaje się za poprawne i można je wykorzystać do przeprowadzenia oceny w zakresie reakcji badanych substancji chemicznych.

22. Kryteria dopuszczalności mają zastosowanie zarówno do wstępnych serii badawczych, jak i do kompleksowych serii badawczych.

▼M8

Tabela 1

Stężenia wzorca referencyjnego, kontroli dodatniej (PC) oraz kontroli ujemnej (NC) w odniesieniu do testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie agonistyczne

	Substancja	NR CAS	Zakres badania (M)
Wzorzec referencyjny	17β-estradiol	50-28-2	$1*10^{-13}$ - $1*10^{-10}$
Kontrola dodatnia (PC)	17α-metylotestosteron	58-18-4	$3*10^{-6}$
Kontrola ujemna (NC)	kortykosteron	50-22-6	$1*10^{-8}$

Tabela 2

Stężenia wzorca referencyjnego, kontroli dodatniej (PC) oraz kontroli ujemnej (NC) w odniesieniu do testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie antagonistyczne

	Substancja	NR CAS	Zakres badania (M)
Wzorzec referencyjny	tamoksyfen	10540-29-1	$3*10^{-9}$ - $1*10^{-5}$
Kontrola dodatnia (PC)	4-hydroksy-tamoksyfen	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Kontrola ujemna (NC)	resweratrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

Tabela 3

Kryteria dopuszczalności agonistycznego testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa

A – poszczególne próbki na płytce		**Kryterium**
1	Maksymalne % SD trzech dołków (w przypadku NC, PC, każdego rozcieńczenia badanej substancji chemicznej i wzorca referencyjnego, z wyłączeniem C0)	< 15 %
2	Maksymalne % SD trzech dołków (w przypadku wzorca referencyjnego oraz kontroli z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej (C0, SC))	< 30 %
3	Maksymalna utrata dehydrogenazy mleczanowej jako wskaźnik cytotoksyczności.	< 120 %
B – w obrębie pojedynczej mikropłytki		
4	Stosunek kontroli z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego (C0; płytka 1) do kontroli z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej (SC; płytki od 2–x)	0,5–2,0
5	Stosunek przybliżonego EC50 i najwyższych stężeń wzorca referencyjnego na płytce 1 oraz przybliżonego EC50 i najwyższych stężeń wzorca referencyjnego na płytce 2 do x (C4, C8)	0,70 do 1,30
6	Czynnik „Z” w przypadku każdej płytki	> 0,6
C – w ramach pojedynczej serii analiz (wszystkie płytki w ramach jednej serii)		
7	Krzywa sigmoidalna wzorca referencyjnego	Tak (17β-estradiol)
8	Wzorzec referencyjny zakresu EC50 (17ß-estradiol)	$4*10^{-12}$ – $4*10^{-11}$ M
9	Minimalna krotność indukcji najwyższego stężenia 17ß-estradiolu w odniesieniu do kontroli z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego.	5
10	Indukcja względna (%) PC.	> 30 %
11	Indukcja względna (%) NC	< 10 %

▼M8

Przybliżony: w przybliżeniu; PC: kontrola dodatnia: NC: kontrola ujemna; SC: kontrola z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej; C0: kontrola z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego; SD: odchylenie standardowe; LDH: dehydrogenaza mleczanowa

Tabela 4

Kryteria dopuszczalności antagonistycznego testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa

A – poszczególne próbki na płytce		**Kryterium**
1	Maksymalne % SD trzech dołków (w przypadku NC, PC, każdego rozcieńczenia badanej substancji chemicznej i wzorca referencyjnego, kontrola z rozpuszczalnikiem (C0))	< 15 %
2	Maksymalne % SD trzech dołków (w przypadku grupy kontrolnej nośnika (VC) i najwyższego stężenia wzorca referencyjnego (C8))	< 30 %
3	Maksymalna utrata dehydrogenazy mleczanowej jako wskaźnik cytotoksyczności.	< 120 %
B – w obrębie pojedynczej mikropłytki		
4	Stosunek kontroli z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego (C0; płytka 1) do kontroli z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej (SC; płytki od 2 do x)	0,70 do 1,30
5	Stosunek przybliżonego stężenia IC50 we wzorcu referencyjnym na płytce 1 do przybliżonego stężenia IC50 we wzorcu referencyjnym na płytkach od 2 do x (C4)	0,70 do 1,30
6	Stosunek najwyższego stężenia wzorca referencyjnego na płytce 1 do najwyższego stężenia wzorca referencyjnego na płytkach od 2 do x (C8)	0,50 do 2,0
7	Czynnik „Z” w przypadku każdej płytki	> 0,6
C – w ramach pojedynczej serii analiz (wszystkie płytki w ramach jednej serii)		
8	Krzywa sigmoidalna wzorca referencyjnego	Tak (Tamoksyfen)
9	Wzorzec referencyjny zakresu IC50 (Tamoksyfen)	$1*10^{-8}$ – $1*10^{-7}$ M
10	Minimalna krotność indukcji kontroli z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego w odniesieniu do najwyższego stężenia Tamoksyfenu.	2,5
11	Indukcja względna (%) PC.	< 70 %
12	Indukcja względna (%) NC	> 85 %

Przybliżony: w przybliżeniu; PC: kontrola dodatnia: NC: kontrola ujemna; VC: grupa kontrolna nośnika (grupa kontrolna z rozpuszczalnikiem bez stałego stężenia wzorca referencyjnego agonisty); SC: kontrola z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej; C0: kontrola z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego; SD: odchylenie standardowe; LDH: dehydrogenaza mleczanowa

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem, wzorce referencyjne, kontrole dodatnie, kontrole ujemne

23. Zarówno w przypadku wstępnej serii badawczej, jak i kompleksowych serii badawczych należy stosować tę samą kontrolę z rozpuszczalnikiem/nośnikiem, te same wzorce referencyjne, kontrole dodatnie i kontrole ujemne. Ponadto stężenie wzorców referencyjnych, kontroli dodatnich i kontroli ujemnych powinno być takie samo.

▼M8

Kontrola z rozpuszczalnikiem

24. Rozpuszczalnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej należy zbadać jako kontrolę z rozpuszczalnikiem. Sufotlenek dimetylowy (DMSO, 1 % (obj./obj.); nr CAS 67-68-5) zastosowano jako nośnik podczas walidacji testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa. Jeśli stosuje się rozpuszczalnik inny niż DMSO, wszystkie wzorce referencyjne, grupy kontrolne i badane substancje chemiczne należy zbadać w tym samym nośniku. Należy zauważyć, że kontrola z rozpuszczalnikiem dotycząca badań antagonistów obejmuje stałe stężenie wzorca referencyjnego agonisty – 17β-estradiolu (w przybliżeniu stężenie EC_{50}). Aby zbadać rozpuszczalnik wykorzystany w badaniach antagonistów, należy przygotować i zbadać grupę kontrolną nośnika.

Grupa kontrolna nośnika (antagonizm)

25. W celu zbadania antagonizmu, pożywkę testową uzupełnia się o stałe stężenie wzorca referencyjnego agonisty – 17β-estradiolu (w przybliżeniu stężenie EC_{50}). Aby zbadać rozpuszczalnik zastosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej w celu uzyskania antagonizmu, należy przygotować pożywkę testową bez stałego stężenia wzorca referencyjnego agonisty – 17β-estradiolu. Ta próbka kontrolna jest oznaczona jako kontrola nośnika. Sufotlenek dimetylowy (DMSO, 1 % (obj./obj.); nr CAS 67-68-5) zastosowano jako nośnik podczas walidacji testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa. Jeśli stosuje się rozpuszczalnik inny niż DMSO, wszystkie wzorce referencyjne, grupy kontrolne i badane substancje chemiczne należy zbadać w tym samym nośniku.

Wzorce referencyjne

26. Wzorzec referencyjny agonisty to 17β-estradiol (tabela 1). Wzorce referencyjne składają się z serii rozcieńczeń ośmiu stężeń 17β-estradiolu ($1*10^{-13}$; $3*10^{-13}$; $1*10^{-12}$; $3*10^{-12}$; $6*10^{-12}$; $1*10^{-11}$; $3*10^{-11}$; $1*10^{-10}$ M).

27. Wzorzec referencyjny antagonisty to tamoksyfen (tabela 2). Wzorce referencyjne składają się z serii rozcieńczeń ośmiu stężeń tamoksyfenu ($3*10^{-9}$; $1*10^{-8}$; $3*10^{-8}$; $1*10^{-7}$; $3*10^{-7}$; $1*10^{-6}$; $3*10^{-6}$; $1*10^{-5}$ M). Każde stężenie wzorca referencyjnego antagonisty poddaje się inkubacji wspólnie ze stałym stężeniem wzorca referencyjnego agonisty – 17β-estradiolu ($3*10^{-12}$ M).

Kontrola dodatnia

28. Kontrola dodatnia w przypadku badań agonistów to 17α-metylotestosteron (tabela 1).

29. Kontrola dodatnia w przypadku badań antagonistów to 4-hydroksy-tamoksyfen (tabela 2). Antagonistyczną kontrolę dodatnią poddaje się inkubacji wspólnie ze stałym stężeniem wzorca referencyjnego agonisty – 17β-estradiolu ($3*10^{-12}$ M).

Kontrola ujemna

30. Kontrola ujemna w przypadku badań agonistów to kortykosteron (tabela 1).

31. Kontrola ujemna w przypadku badań antagonistów to resweratrol (tabela 2). Antagonistyczną kontrolę ujemną poddaje się inkubacji wspólnie ze stałym stężeniem wzorca referencyjnego agonisty – 17β-estradiolu ($3*10^{-12}$ M).

▼M8

Wykazanie biegłości laboratorium (zob. pkt 14 oraz tabela 3 i 4 w „ELEMENTY BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO” niniejszej metody badawczej)

Nośnik

32. Rozpuszczalnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej powinien całkowicie rozpuścić badaną substancję chemiczną i powinien być mieszalny z podłożem komórkowym. DMSO, woda i etanol (95–100 % czystości) to odpowiednie rozpuszczalniki. W przypadku gdy jako rozpuszczalnik stosuje się DMSO, maksymalne stężenie DMSO w trakcie inkubacji nie powinno przekroczyć 1 % (obj./obj.). Przed zastosowaniem należy zbadać rozpuszczalnik w kierunku braku cytotoksyczności i oddziaływania na efektywność testu.

Przygotowanie wzorców referencyjnych, kontroli dodatnich, kontroli ujemnych i badanych substancji chemicznych

33. Wzorce referencyjne, kontrole dodatnie, kontrole ujemne i badane substancje chemiczne rozpuszcza się w 100 % DMSO (lub właściwym rozpuszczalniku). Następnie należy przygotować właściwe stężenia (serię stężeń wzrastających w postępie geometrycznym) w tym samym rozpuszczalniku. Przed rozpuszczeniem należy pozwolić, aby temperatura wszystkich substancji wyrównała się z temperaturą pokojową. Świeżo przygotowane roztwory podstawowe wzorców referencyjnych, kontroli dodatnich, kontroli ujemnych i badanych substancji chemicznych nie powinny zawierać zauważalnego osadu ani nie powinny być mętne. Wzorzec referencyjny i roztwory kontrolne można przygotować w dużej ilości. Przed każdym doświadczeniem należy przygotowywać świeże roztwory podstawowe badanych substancji chemicznych. Do każdego doświadczenia należy przygotować świeże ostateczne rozcieńczenia wzorców referencyjnych, kontroli dodatnich, kontroli ujemnych i badanych substancji chemicznych i wykorzystać w ciągu 24 godzin od przygotowania.

Rozpuszczalność, cytotoksyczność i zakres dawkowania.

34. We wstępnej serii badawczej określa się rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w wybranym rozpuszczalniku. Przygotowuje się maksymalne stężenie roztworu wynoszące 0,1 M. W przypadku gdy to stężenie wykazuje problemy z rozpuszczalnością, należy przygotowywać roztwory podstawowe o niższym stężeniu, do czasu aż badane substancje chemiczne zostaną w pełni rozpuszczone. We wstępnej serii badawczej bada się serię stężeń badanej substancji chemicznej wzrastających w postępie geometrycznym w stosunku 1:10. Maksymalne stężenie próby w przypadku badania agonistów lub antagonistów wynosi 1 mM. Po przeprowadzeniu próby wstępnej określa się właściwy zawężony zakres czystego stężenia badanej substancji chemicznej, które należy zbadać w kompleksowych seriach badawczych. Stężenia wykorzystywane w badaniu kompleksowym powinny wynosić 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x i 3000x.

35. Badanie cytotoksyczności zostało uwzględnione w protokole testów agonisty i antagonisty (11). Zarówno wstępna seria badawcza, jak i kompleksowe serie badawcze obejmują badanie cytotoksyczności. Metodą zastosowaną, aby ocenić cytotoksyczność podczas walidacji testu biologicznego z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na działanie receptora estrogenowego alfa było badanie utraty dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w połączeniu z jakościową kontrolą wzrokową komórek (zob. dodatek 4.1) po narażeniu na działanie badanych substancji chemicznych. Aby określić cytotoksyczność można zastosować jednak inne jakościowe metody (np. analizę kolometryczną opartą na MTT (test MTT) lub test biologiczny z ekspresją aktywowanych chemicznie genów lucyferazy wrażliwych na cytotoksyczność). Zasadniczo stężenia badanej substancji chemicznej wykazujące ponad 20 % zmniejszenie żywotności komórek uznaje się za cytotoksyczne i w związku z tym nie można ich wykorzystać do oceny danych. Jeżeli chodzi o badanie utraty LDH, stężenie badanej substancji chemicznej uważa się za cytotoksyczne, w przypadku gdy procentowa utrata LDH jest wyższa niż 120 %.

▼M8

Narażenie na działanie badanej substancji chemicznej oraz organizacja płytki testowej

36. Po przeprowadzeniu trypsynizacji kolby zlewającej się hodowli komórek, komórki ponownie zawiesza się w pożywce testowej wolnej od estrogenu w ilości $1x10^5$ komórek/ml. Sto µl ponownie zawieszonych komórek posiewa się na wewnętrznych dołkach płytki 96-dołkowej. Zewnętrzne dołki wypełnia się 200 µl roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) (zob. rysunek 1 i 2). Wysiane komórki poddaje się wstępnej inkubacji przez 24 godziny w inkubatorze CO_2 (w atmosferze zawierającej 5 % CO_2, w 37 °C, przy 100 % wilgotności).

37. Po wstępnej inkubacji płytki poddaje się kontroli w kierunku widocznej cytotoksyczności (zob. dodatek 4.1), skażenia i konfluencji. Do badania wykorzystuje się wyłącznie płytki wykazujące brak widocznej cytotoksyczności, skażenia i posiadające co najmniej 85 % konfluencję. Usuwa się dokładnie podłoże z wewnętrznych dołków i zastępuje je 200 µl pożywki testowej wolnej od estrogenu, zawierającej odpowiednie serie rozcieńczeń wzorców referencyjnych, badanych substancji chemicznych, kontroli dodatnich, kontroli ujemnych i kontroli z rozpuszczalnikiem (tabela 5: badanie agonisty; tabela 6: badanie antagonisty). Wszystkie wzorce referencyjne, badane substancje chemiczne, kontrole dodatnie, kontrole ujemne i kontrole z rozpuszczalnikiem bada się trzykrotnie. Na rysunku 1 przedstawiono rozkład na płytce służącej do badania agonisty. Na rysunku 2 przedstawiono rozkład na płytce służącej do badania antagonisty. Rozkład na płytce służącej do badania wstępnego i kompleksowego jest taki sam. W przypadku badania antagonisty wszystkie wewnętrzne dołki z wyjątkiem dołków grupy kontrolnej nośnika (VC) również zawierają stałe stężenie wzorca referencyjnego agonisty – 17β-estradiolu ($3*10^{-12}$ M). Należy zauważyć, że wzorce referencyjne C8 i C4 należy dodać do każdej płytki TC.

38. Po narażeniu komórek na działanie wszystkich substancji chemicznych płytki 96-dołkowe należy poddać wstępnej inkubacji przez kolejne 24 godziny w inkubatorze CO_2 (w atmosferze zawierającej 5 % CO_2, w 37 °C, przy 100 % wilgotności).

Rysunek 1

Rozkład na płytce w przypadku płytek 96-dołkowych służących do przeprowadzenia próby wstępnej i oceny wpływu agonistycznego.

Płytka 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												

Kolejne płytki

	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	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
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 = rozpuszczalnik wzorca referencyjnego.

C(1-8) = serie rozcieńczeń (1–8, od niskich do wysokich stężeń) wzorca referencyjnego.

▼M8

PC = kontrola dodatnia.

NC = kontrola ujemna.

TCx-(1-8) = rozcieńczenia (1–8, od niskich do wysokich stężeń) badanej substancji chemicznej wykorzystywanej do przeprowadzenia wstępnej serii badawczej i oceny wpływu agonistycznego badanej substancji chemicznej x.

SC = kontrola z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej (optymalnie ten sam rozpuszczalnik co w przypadku C0, ale w miarę możliwości z innej partii).

Komórki oznaczone kolorem szarym: = Zewnętrzne dołki, wypełnione 200 µl PBS.

Rysunek 2

Rozkład na płytce w przypadku płytek 96-dołkowych służących do przeprowadzenia antagonistycznej próby wstępnej i oceny wpływu antagonistycznego.

Płytka 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												

Kolejne płytki

	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 (maks.)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (maks.)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (maks.)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (maks.)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (maks.)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (maks.)	
H												

C0 = rozpuszczalnik wzorca referencyjnego.

C(1-8) = serie rozcieńczeń (1–8, od niskich do wysokich stężeń) wzorca referencyjnego.

NC = kontrola ujemna.

PC = kontrola dodatnia.

TCx-(1-8) = rozcieńczenia (1–8, od niskich do wysokich stężeń) badanej substancji chemicznej wykorzystywanej do przeprowadzenia wstępnej serii badawczej i oceny wpływu agonistycznego badanej substancji chemicznej x.

SC = kontrola z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej (optymalnie ten sam rozpuszczalnik co w przypadku C0, ale w miarę możliwości z innej partii).

VC = grupa kontrolna nośnika (kontrola rozpuszczalnika bez stałego stężenia wzorca referencyjnego agonisty – 17β-estradiolu).

Komórki oznaczone kolorem szarym: = Zewnętrzne dołki, wypełnione 200 µl PBS.

Uwaga: wszystkie wewnętrzne dołki z wyjątkiem dołków grupy kontrolnej nośnika (VC) również zawierają stałe stężenie wzorca referencyjnego agonisty – 17β-estradiolu ($3{,}0*10^{-12}$ M)

Pomiar luminescencji

39. Pomiar luminescencji szczegółowo opisano w protokole testu dotyczącego agonisty i antagonisty (10). Po 24 godzinach inkubacji należy usunąć podłoże z dołków i poddać komórki procesowi lizy, aby otworzyć błonę komórkową i umożliwić dokonanie pomiaru aktywności lucyferazy.

▼M8

40. Aby dokonać pomiaru luminescencji, procedura ta wymaga luminometra wyposażonego w 2 iniektory. Reakcję lucyferazy rozpoczyna się poprzez wstrzyknięcie substratu – lucyferyny. Reakcję przerywa się poprzez dodanie 0,2 M NaOH. Reakcję przerywa się, aby zapobiec przeniesieniu luminescencji z jednego dołka do drugiego.

41. Światło emitowane z każdego dołka wyraża się jako względną jednostkę światła (RLU) w przeliczeniu na dołek.

Wstępna seria badawcza

42. Wyniki analizy wstępnej wykorzystuje się, aby określić zawężony zakres stężenia badanych substancji chemicznych służący do przeprowadzenia badania kompleksowego. Ocenę wyników analizy wstępnej i określenie zawężonego zakresu stężenia badanej substancji chemicznej służącej do przeprowadzenia badania kompleksowego szczegółowo opisano w protokole próby dotyczącej agonisty i antagonisty (10). Poniżej podano krótkie streszczenie procedur służących do określenia zakresu stężenia badanych substancji chemicznych służących do przeprowadzenia badania agonisty i antagonisty. Zob. tabela 5 i 6, aby zapoznać się z wytycznymi dotyczącymi planu serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym.

Wybór stężeń do przeprowadzenia oceny wpływu agonistycznego

43. We wstępnej serii badawczej należy zbadać badane substancje chemiczne, wykorzystując serię rozcieńczeń zgodnie z tabelą 5 (agonista) i 6 (antagonista). Wszystkie stężenia należy zbadać w trzech dołkach zgodnie z rozkładem na płytce wskazanym na rysunku 1 (agonista) lub 2 (antagonista).

44. Wyłącznie wyniki analizy, które spełniają kryteria dopuszczalności (tabela 3) uznaje się za poprawne i można je wykorzystać do przeprowadzenia oceny w zakresie reakcji badanych substancji chemicznych. W przypadku gdy jedna mikropłytka lub większa ich liczba w serii analiz nie spełnia kryteriów dopuszczalności, odpowiednie mikropłytki należy ponownie poddać analizie. W przypadku gdy pierwsza płytka zawierająca całą serię rozcieńczeń wzorca referencyjnego nie spełni kryteriów dopuszczalności, konieczne jest ponowne poddanie analizie całej serii badań (6 płytek).

45. Należy dostosować zakresy stężenia początkowego badanych substancji chemicznych i powtórzyć wstępną serię badawczą, w przypadku gdy:

— zaobserwowano cytotoksyczność. Należy powtórzyć wstępną procedurę przy niższych niecytotoksycznych stężeniach badanej substancji chemicznej;

— próba wstępna badanych substancji chemicznych nie wykazuje pełnej krzywej dawka-efekt, ponieważ badane stężenia generują maksymalną indukcję. Należy powtórzyć wstępną serię badawczej, stosując niższe stężenia badanej substancji chemicznej.

46. Jeśli zaobserwowano poprawną zależność dawka-odpowiedź, należy wybrać (najniższe) stężenie, w przypadku którego obserwuje się maksymalną indukcję, i które nie wykazuje cytotoksyczności. Najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej, która ma zostać zbadana w kompleksowych seriach badawczych, powinno być 3 razy wyższe niż przedmiotowe wybrane stężenie.

47. Całą serię czystych rozcieńczeń badanej substancji chemicznej należy przygotować zgodnie z etapami rozcieńczania wskazanymi w tabeli 5, rozpoczynając od najwyższego stężenia, jak określono powyżej.

▼M8

48. Badaną substancję chemiczną, która nie wykazuje wpływu agonistycznego należy zbadać w kompleksowych seriach badawczych, rozpoczynając od najwyższego, niecytotoksycznego stężenia określonego we wstępnej serii badawczej.

Wybór stężeń do przeprowadzenia oceny wpływu antagonistycznego

49. Wyłącznie wyniki analizy, które spełniają kryteria dopuszczalności (tabela 4) uznaje się za poprawne i można je wykorzystać do przeprowadzenia oceny w zakresie reakcji badanych substancji chemicznych. W przypadku gdy jedna mikropłytka lub większa ich liczba w serii analiz nie spełnia kryteriów dopuszczalności, odpowiednie mikropłytki należy ponownie poddać analizie. W przypadku gdy pierwsza płytka zawierająca całą serię rozcieńczeń wzorca referencyjnego nie spełni kryteriów dopuszczalności, konieczne jest ponowne poddanie analizie całej serii badań (6 płytek).

50. Należy dostosować zakresy stężenia początkowego badanych substancji chemicznych i powtórzyć wstępną serię badawczą, w przypadku gdy:

— zaobserwowano cytotoksyczność. Należy powtórzyć wstępną procedurę przy niższych niecytotoksycznych stężeniach badanej substancji chemicznej;

— próba wstępna badanych substancji chemicznych nie wykazuje pełnej krzywej dawka-efekt, ponieważ badane stężenia generują maksymalną inhibicję. Należy powtórzyć próbę wstępną, stosując niższe stężenia badanej substancji chemicznej.

51. Jeśli stwierdzono poprawną zależność dawka-odpowiedź, należy wybrać (najniższe) stężenie, w przypadku którego obserwuje się maksymalną inhibicję, i które nie wykazuje cytotoksyczności. Najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej, która ma zostać zbadana w kompleksowych seriach badawczych, powinno być 3 razy wyższe niż przedmiotowe wybrane stężenie.

52. Całą serię czystych rozcieńczeń badanej substancji chemicznej należy przygotować zgodnie z etapami rozcieńczania wskazanymi w tabeli 6, rozpoczynając od najwyższego stężenia, jak określono powyżej.

53. Badane substancje chemiczne, które nie wykazują wpływu antagonistycznego należy zbadać w kompleksowych seriach badawczych, rozpoczynając od najwyższego, niecytotoksycznego stężenia badanego we wstępnej serii badawczej.

Kompleksowe serie badawcze

54. Po dokonaniu wyboru zawężonych zakresów stężenia należy kompleksowo zbadać badane substancje chemiczne, wykorzystując serię rozcieńczeń zgodnie z tabelą 5 (agonista) i 6 (antagonista). Wszystkie stężenia należy zbadać w trzech dołkach zgodnie z rozkładem na płytce wskazanym na rysunku 1 (agonista) lub 2 (antagonista).

55. Wyłącznie wyniki analizy, które spełniają kryteria dopuszczalności (tabela 3 i 4) uznaje się za poprawne i można je wykorzystać do przeprowadzenia oceny w zakresie reakcji badanych substancji chemicznych. W przypadku gdy jedna mikropłytka lub większa ich liczba w serii analiz nie spełnia kryteriów dopuszczalności, odpowiednie mikropłytki należy ponownie poddać analizie. W przypadku gdy pierwsza płytka zawierająca całą serię rozcieńczeń wzorca referencyjnego nie spełni kryteriów dopuszczalności, konieczne jest ponowne poddanie analizie całej serii badań (6 płytek).

▼**M8**

Tabela 5

Stężenie i rozcieńczenia wzorców referencyjnych, kontroli i badanych substancji chemicznych stosowanych do przeprowadzenia badania agonisty

Wzorzec porównawczy – 17β-estradiol		TCx – wstępna seria badawcza		TCx – kompleksowa seria badawcza		Kontrole	
stężenie (M)		rozcieńczenie		rozcieńczenie		stężenie (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 – badana substancja chemiczna x
PC – kontrola dodatnia (17α-metylotestosteron)
NC – kontrola ujemna (kortykosteron)
C0 – kontrola z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego
SC – kontrola z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej

▼**M8**

Tabela 6

Stężenie i rozcieńczenia wzorców referencyjnych, kontroli i badanych substancji chemicznych stosowanych do przeprowadzenia badania antagonisty

Wzorzec porównawczy – tamoksyfen		TCx – wstępna seria badawcza		TCx – kompleksowa seria badawcza		Kontrole	
stężenie (M)		rozcieńczenie		rozcieńczenie		stężenie (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Wzbogacony agonista**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**stężenie (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx – badana substancja chemiczna x
PC – kontrola dodatnia (4-hydroksy-tamoksyfen)
NC – kontrola ujemna (resweratrol)
C0 – kontrola z rozpuszczalnikiem wzorca referencyjnego
SC – kontrola z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej
VC – grupa kontrolna nośnika (nie zawiera stałego stężenia wzorca referencyjnego agonisty – 17β-estradiolu ($3,0*10^{-12}$ M))

▼M8

Gromadzenie i analiza danych

56. Po przeprowadzeniu wstępnej serii badawczej i kompleksowych serii badawczych należy określić EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} i maksymalną indukcję (TC_{max}) badanej substancji chemicznej służącej do przeprowadzenia badania agonisty. Do celów przeprowadzenia badania antagonisty należy obliczyć IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} i minimalną indukcję (TCx_{min}). Na rysunku 3 (agonista) i 4 (antagonista) podano graficzne przedstawienie tych parametrów. Wymagane parametry oblicza się na podstawie indukcji względnej każdej badanej substancji chemicznej (od względnej do maksymalnej indukcji wzorca referencyjnego (= 100 %)). Do celów przeprowadzenia oceny danych należy zastosować regresję nieliniową (zmienne nachylenie, 4 parametry) zgodnie z poniższym równaniem:

$$Y = Bottom + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{(1 + 10^{(lgEC_{50} - X) \times Hill\ Slope})}$$

gdzie:

X = Logarytm dawkowania lub stężenia

Y = Reakcja (indukcja względna (%))

Najwyższa wartość = Maksymalna indukcja (%)

Najniższa wartość = Minimalna indukcja (%)

$LogEC_{50}$ = Logarytm stężenia, w przypadku którego obserwuje się 50 % maksymalnej reakcji

Krzywa Hilla = Współczynnik nachylenia krzywej Hilla

57. Dane surowe z luminometra, wyrażone jako względna jednostka światła (RLU) należy przenieść do arkusza kalkulacyjnego analizy danych opracowanego do celów wstępnej serii badawczej i kompleksowych serii badawczych. Dane surowe powinny spełniać kryteria dopuszczalności wskazane w tabeli 3A i 3B (agonista) lub 4A i 4B (antagonista). W przypadku gdy dane surowe spełniają kryteria dopuszczalności, przeprowadza się następujące etapy obliczeń, aby określić wymagane parametry:

Agonizm

— Odjąć średnią RLU kontroli z rozpuszczalnikiem wzorca porównawczego od wszelkich surowych danych uzyskanych w wyniku analizy wzorców referencyjnych.

— Odjąć średnią RLU kontroli z rozpuszczalnikiem badanej substancji chemicznej od wszelkich surowych danych uzyskanych w wyniku analizy badanych substancji chemicznych.

— Obliczyć indukcję względną każdego stężenia wzorca referencyjnego. Ustalić indukcję najwyższego stężenia wzorca referencyjnego na 100 %.

— Obliczyć indukcję względną każdego stężenia badanej substancji chemicznej w porównaniu z najwyższym stężeniem wzorca referencyjnego jako 100 %.

— Przeprowadzić ocenę wyników analizy zgodnie z regresją nieliniową (zmienne nachylenie, 4 parametry).

▼M8

— Określić EC_{50} i EC_{10} wzorca referencyjnego.

— Określić EC_{50} i EC_{10} badanych substancji chemicznych.

— Określić maksymalną względną indukcję badanej substancji chemicznej (TC_{max}).

— Określić PC_{10} i PC_{50} badanych substancji chemicznych.

W przypadku badanej substancji chemicznej możliwe jest, że pełna krzywa dawka-efekt nie zawsze zostanie uzyskana, np. ze względu na cytotoksyczność lub problemy z rozpuszczalnością. W związku z nie można określić EC_{50}, EC_{10} i PC_{50}. W takich przypadkach można określić jedynie PC_{10} i TC_{max}.

Antagonizm

— Odjąć średnią RLU kontroli z najwyższego stężenia wzorca referencyjnego od wszelkich surowych danych uzyskanych w wyniku analizy wzorców referencyjnych.

— Odjąć średnią RLU kontroli z najwyższego stężenia wzorca referencyjnego od wszelkich surowych danych uzyskanych w wyniku analizy badanych substancji chemicznych.

— Obliczyć indukcję względną każdego stężenia wzorca referencyjnego. Ustalić indukcję najniższego stężenia wzorca referencyjnego na 100 %.

— Obliczyć indukcję względną każdego stężenia badanej substancji chemicznej w porównaniu z najniższym stężeniem wzorca referencyjnego jako 100 %.

— Przeprowadzić ocenę wyników analizy zgodnie z regresją nieliniową (zmienne nachylenie, 4 parametry).

— Określić IC_{50} i IC_{20} wzorca referencyjnego.

— Określić IC_{50} i IC_{20} badanych substancji chemicznych.

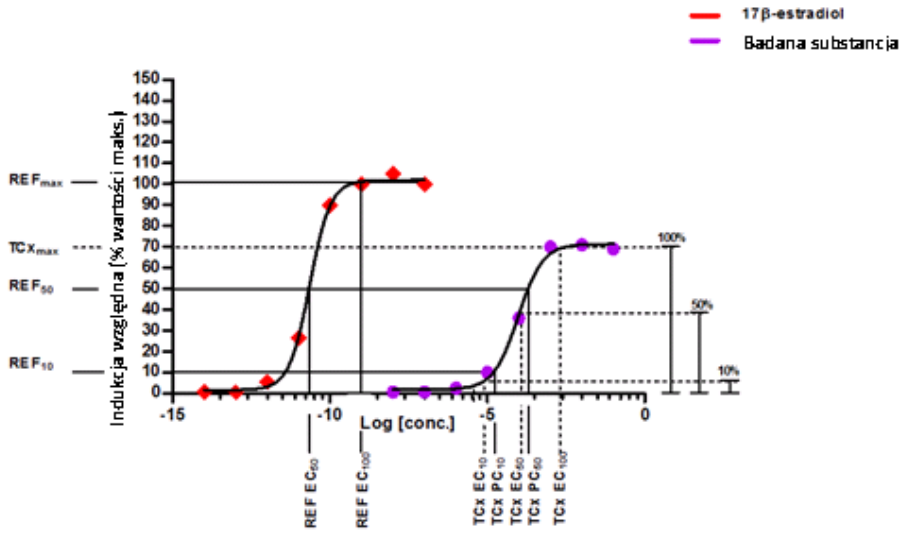
— Określić minimalną względną indukcję badanej substancji chemicznej (TC_{min}).

— Określić PC_{80} i PC_{50} badanych substancji chemicznych.

▼M8

Rysunek 3

Przegląd parametrów określonych w teście agonisty



EC_{10} = stężenie substancji, przy którym obserwuje się 10 % jej maksymalnej reakcji.

EC_{50} = stężenie substancji, przy którym obserwuje się 50 % jej maksymalnej reakcji.

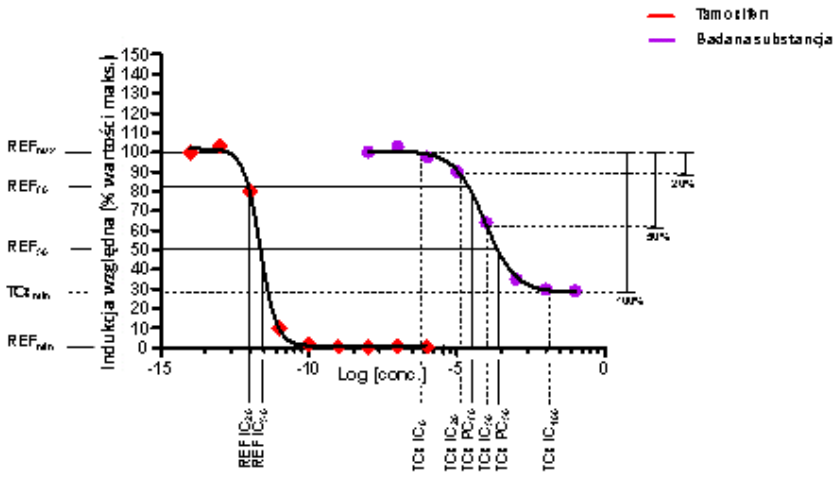
PC_{10} = stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym jej reakcja jest równa EC_{10} wzorca referencyjnego.

PC_{50} = stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym jej reakcja jest równa EC_{50} wzorca referencyjnego.

TCx_{max} = maksymalna indukcja względna badanej substancji chemicznej.

Rysunek 4

Przegląd parametrów określonych w teście antagonisty



IC20 = stężenie substancji, przy którym obserwuje się 80 % jej maksymalnej reakcji (20 % inhibicji).

▼**M8**

IC50 = stężenie substancji, przy którym obserwuje się 50 % jej maksymalnej reakcji (50 % inhibicji).

PC80 = stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym jej reakcja jest równa IC20 wzorca referencyjnego.

PC50 = stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym jej reakcja jest równa IC50 wzorca referencyjnego.

TCxmin = minimalna indukcja względna badanej substancji chemicznej.

W przypadku badanej substancji chemicznej możliwe jest, że pełna krzywa dawka-efekt nie zawsze zostanie uzyskana, np. ze względu na cytotoksyczność lub problemy z rozpuszczalnością. W związku z nie można określić IC_{50}, IC_{20} i PC_{50}. W takich przypadkach można określić jedynie PC_{20} i TC_{min}.

58. Wyniki powinny opierać się na dwóch (lub trzech) niezależnych seriach badawczych. Jeżeli dwie serie badawcze dają porównywalne i tym samym odtwarzalne wyniki, nie jest konieczne wykonywanie trzeciej serii. Aby wyniki zostały dopuszczone, powinny:

— spełniać kryteria dopuszczalności (zob. kryteria dopuszczalności pkt 14–22);

— być powtarzalne.

Kryteria interpretacji danych

59. Do celów interpretacji danych i podjęcia decyzji, czy badaną substancję chemiczną uznaje się za dodatnią lub ujemną stosuje się następujące kryteria:

Agonizm

W przypadku każdej kompleksowej serii badawczej badaną substancję chemiczną uznaje się za **dodatnią**, jeśli:

1 TC_{max} jest równe 10 % maksymalnej reakcji wzorca referencyjnego (REF_{10}) lub je przekracza.

2 Co najmniej 2 kolejne stężenia badanej substancji chemicznej są równe REF_{10} lub je przekraczają.

W przypadku każdej kompleksowej serii badawczej badaną substancję chemiczną uznaje się za **ujemną**, jeśli:

1 TCmax nie przekracza 10 % maksymalnej reakcji wzorca referencyjnego (REF10).

2 Mniej niż 2 kolejne stężenia badanej substancji chemicznej są równe REF10 lub je przekraczają.

Antagonizm

W przypadku każdej kompleksowej serii badawczej badaną substancję chemiczną uznaje się za **dodatnią**, jeśli:

1 TCmin jest równe lub niższe niż 80 % maksymalnej reakcji wzorca referencyjnego (REF80 = 20 % inhibicji).

2 Co najmniej 2 kolejne stężenia badanej substancji chemicznej są równe lub niższe niż REF80.

▼**M8**

W przypadku każdej kompleksowej serii badawczej badaną substancję chemiczną uznaje się za **ujemną**, jeśli:

1 TCmin przekracza 80 % maksymalnej reakcji wzorca referencyjnego (REF80 = 20 % inhibicji).

2 Mniej niż 2 kolejne stężenia badanej substancji chemicznej są równe lub niższe niż REF80.

60. Aby scharakteryzować siłę działania reakcji dodatniej badanej substancji chemicznej należy zgłosić wielkość wpływu (agonista: TC_{max}; antagonista: TC_{min}) oraz stężenie, przy którym nastąpił wpływ (agonista: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonista: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

61. Zob. pkt 20 dotyczący „ELEMENTÓW BADANIA AKTYWACJI TRANSKRYPCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO”.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2016). *Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential.* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 240. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(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.”* nr 83(1), s. 136–148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, i 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” nr 142(3), s. 1156–1166.

(4) Thorne N, Inglese J i Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other *Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology*, [W:] „Chemistry and Biology” nr 17(6), s. 646–57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V i Balaguer P. (2006). *Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta*, „*Biochem*. Pharmacol.” nr 71, s. 1459–1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B i Gustafsson JA. (1998). *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*, „Endocrinol.” nr 139, s. 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.” nr 122, s. 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, i van der Burg B. (2006). *Comparison of* in vitro *and* in vivo *screening models for androgenic and estrogenic activities*, „*Toxicol*. Sci.” nr 89(1), s. 173–187.

▼**M8**

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M i Ishii H. (1995). *Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products*. „J. Vet. Med. Sci." nr 57(4), s. 769–771.

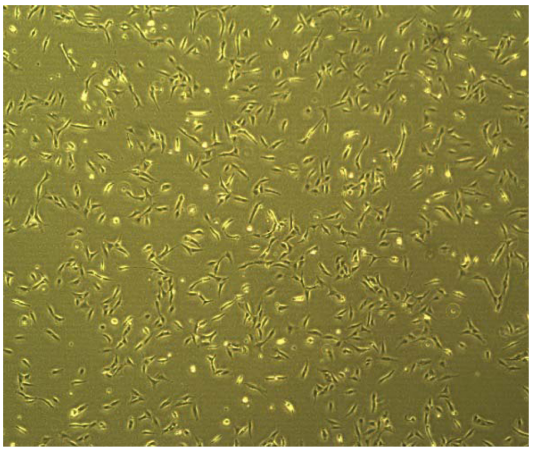
(10) Zhang J-H, Chung TDY i Oldenburg KR. (1999). *A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays*, „J. Biomol. Scr." nr 4, s. 67–73.

(11) Besselink H, Middelhof I, i Felzel, E. (2014). *Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells*, BioDetection Systems BV (BDS), Amsterdam, Niderlandy.

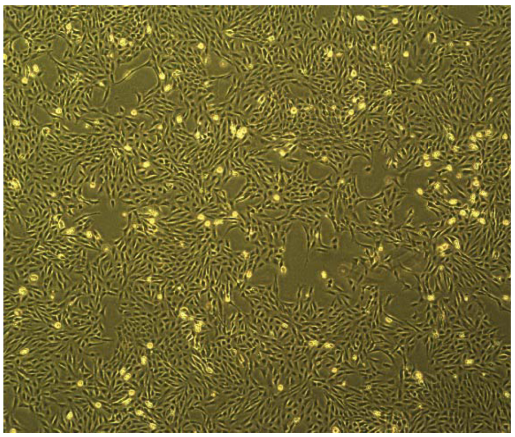
▼**M8**

Dodatek 4.1:

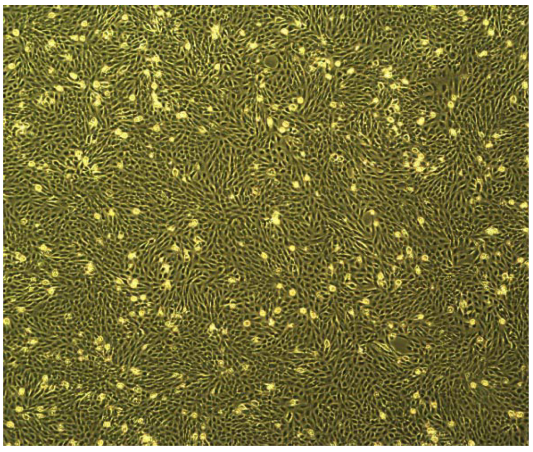
KONTROLA WZROKOWA ŻYWOTNOŚCI KOMÓREK



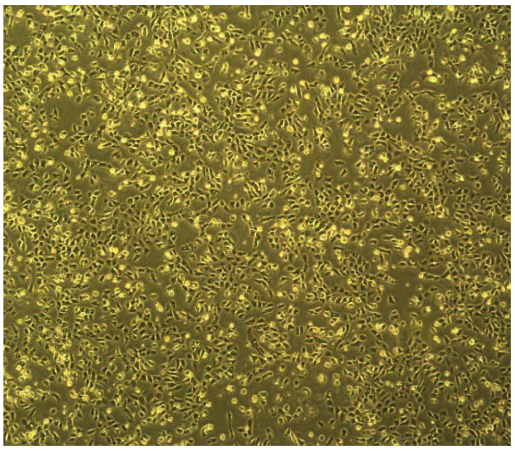
< 5 % konfluencji. Komórki zostały niedawno posiane. 100 % żywotność komórek. Klasyfikacja: „brak cytotoksyczności”



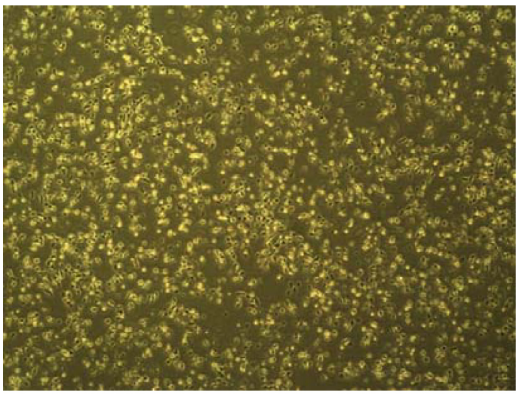
> 85 % konfluencji. Na tym etapie komórki poddaje się działaniu badanych substancji chemicznych. > 95 % żywotność komórek. Klasyfikacja: „brak cytotoksyczności”



> 95 % konfluencji. Komórki są gęsto rozmieszczone i zaczynają się rozrastać. > 95 % żywotność komórek.
Klasyfikacja: „brak cytotoksyczności”



< 25 % żywotność komórek. Komórki zaczynają się oddzielać i styczność między komórkami spada. Komórki są zaokrąglone. Klasyfikacja: „cytotoksyczność”



< 5 % żywotność komórek. Komórki są w pełni rozdzielone i styczność między komórkami jest przerwana. Komórki są zaokrąglone. Klasyfikacja: „cytotoksyczność”

▼M8

B.67 TESTY MUTACJI GENOWYCH NA KOMÓRKACH SSAKÓW *IN VITRO* Z WYKORZYSTANIEM GENU KINAZY TYMIDYNOWEJ

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 490 (2016). Metody badawcze są okresowo poddawane przeglądowi i zmianom w związku z postępem naukowym, potrzebami regulacyjnymi i dobrostanem zwierząt. Początkowo test na mysich chłoniakach i test TK6 z wykorzystaniem locusu kinazy tymidynowej wchodziły w skład metody badawczej B.17. Następnie grupa robocza ekspertów ds. badania mysich chłoniaków międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych (IWGT) opracowała zharmonizowane na szczeblu międzynarodowym zalecenia w zakresie kryteriów dopuszczalności testu oraz interpretacji danych dotyczących badania mysich chłoniaków (1)(2)(3)(4)(5) i zalecenia te włączono do niniejszej nowej metody badawczą B.67. Niniejszą metodę badawczą opisano w odniesieniu do badania mysich chłoniaków, a ponieważ wykorzystuje również locus TK, także badania TK6. Mimo że badanie mysich chłoniaków stosowano w dużym zakresie do celów regulacyjnych, TK6 stosowano znacznie rzadziej. Należy zauważyć, że pomimo podobieństwa między punktami końcowymi te dwie linie komórkowe nie są zamienne i w programach regulacyjnych można prawomocnie wyrazić preferencję w stosunku do jednej w odniesieniu do określonego zastosowania regulacyjnego. Na przykład w ramach walidacji badania mysich chłoniaków wykazano, że jest ono odpowiednie do wykrycia nie tylko mutacji genowej, ale również zdolności badanej substancji chemicznej do wywoływania strukturalnej aberracji chromosomowej. Niniejsza metoda badawcza stanowi część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. OECD opracowała dokument, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd najnowszych zmian, jakie wprowadzono do wytycznych OECD dotyczących badań w zakresie toksykologii genetycznej (6).

2. Celem testów mutacji genowych na komórkach ssaków *in vitro* jest wykrycie mutacji genowych wywołanych przez substancje chemiczne. Linie komórkowe wykorzystane w tych badaniach mierzą mutacje pierwotne w genach reporterowych, w szczególności w endogennym genie kinazy tymidynowej (*TK* w odniesieniu do komórek ludzkich i *Tk* w przypadku komórek gryzoni, które w niniejszej metodzie badawczej zbiorczo nazywa się *TK*). Niniejsza metoda badawcza jest przeznaczona do stosowania dwóch linii komórkowych: linii komórkowej mysiego chłoniaka L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C (ogólnie nazywanej L5178Y) oraz linii komórkowej ludzkiej komórki limfoblastycznej TK6 (ogólnie nazywanej TK6). Chociaż te dwie linie komórkowe różnią się z powodu swojego pochodzenia, wzrostu komórki, statusu p-53 itp. badania mutacji genowej *TK* można przeprowadzać w podobny sposób w obu rodzajach komórek, jak opisano w niniejszej metodzie badawczej.

3. Autosomalny i heterozygotyczny charakter genu kinazy tymidynowej umożliwia wykrycie żywotnych kolonii, których komórki wykazują niedobór enzymu kinazy tymidynowej w następstwie mutacji z $TK^{+/-}$ do TK. Niedobór ten może wynikać ze zdarzeń genetycznych wpływających na gen *TK*, w tym zarówno mutacji genowych (mutacji punktowej, mutacji zmiany fazy odczytu, niewielkich delecji itp.), jak i zdarzeń chromosomowych (dużych delecji, rearanżacji chromosomów i rekombinacji mitotycznej). Zdarzenia chromosomowe wyraża się jako utratę heterozygotyczności, co stanowi powszechną zmianę genetyczną antyonkogenów w ludzkiej onkogenezie. Teoretycznie utratę całego chromosomu zawierającego gen *TK* wynikającą z uszkodzenia wrzeciona lub mitotycznej nondysjunkcji można wykryć w badaniu mysich chłoniaków. W rzeczywistości połączenie cytogenetycznej i molekularnej analizy wyraźnie wykazuje, że niektóre mutanty kinazy tymidynowej w badaniu mysich chłoniaków są wynikiem nondysjunkcji. Waga dowodów wykazuje jednak, że w ramach badania mutacji genowej *TK* nie można skutecznie wykryć aneugenów, stosując standardowe kryteria cytotoksyczności (jak opisano w niniejszej metodzie badawczej) i w związku z tym stosowanie tych badań w celu wykrycia aneugenów nie jest właściwe (7)(8)(9).

▼M8

4. W ramach badań mutacji genowej *TK* generuje się dwie różne fenotypowe klasy mutacji *TK*; mutanty rozwijające się zwyczajnie, rozwijające się w tym samym tempie co heterozygotyczne komórki kinazy tymidynowej oraz mutanty rozwijające się powoli, które rozwijają się przy wydłużonym czasie podwojenia. W badaniu mysich chłoniaków mutanty rozwijające się zwyczajnie i mutanty rozwijające się powoli uznaje się za mutanty dużych i małych kolonii oraz za mutanty wcześnie i późno pojawiających się kolonii w badaniu TK6. Charakter cytogenetyczny oraz charakter budowy cząsteczkowej mutantów badania mysich chłoniaków, zarówno małych, jak i dużych kolonii, został szczegółowo zbadany (8)(10)(11)(12)(13). Charakter cytogenetyczny oraz charakter budowy cząsteczkowej wcześnie i późno pojawiających się mutantów TK6 również obszernie zbadano (14)(15)(16)(17). Mutanty rozwijające się powoli w przypadku obu rodzajów komórek doznały uszkodzenia genetycznego obejmującego rzekome geny regulujące wzrost w pobliżu locusu *TK*, co skutkuje wydłużonym czasem podwojenia oraz utworzeniem się późno pojawiających się lub małych kolonii (18). Indukcję mutantów rozwijających się powoli przypisuje się substancjom chemicznym, które powodują duże zmiany strukturalne na poziomie chromosomów. Komórki, których uszkodzenie nie obejmuje rzekomych genów regulujących wzrost w pobliżu locusu TK rozwijają się w tempie podobnym do komórek macierzystych i stają się mutantami rozwijającymi się zwyczajnie. Indukcję mutantów głównie rozwijających się zwyczajnie przypisuje się substancjom chemicznym działającym przede wszystkim jako mutageny powodujące mutację punktową. W związku z tym istotne jest policzenie zarówno mutantów rozwijających się powoli, jak i mutantów rozwijających się zwyczajnie, aby wykryć wszystkie mutanty i dostarczyć informacji na temat rodzajów uszkodzenia (mutagenów i klastogenów) wywołanego przez badaną substancję chemiczną (10)(12)(18)(19).

5. Metodę badawczą zorganizowano w taki sposób, aby dostarczyć ogólnych informacji mających zastosowanie zarówno do badania mysich chłoniaków, jak i badania TK6 oraz zapewnić specjalistyczne wytyczne dotyczące poszczególnych badań.

6. Zastosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

7. Badania przeprowadzane *in vitro* wymagają zazwyczaj wykorzystania egzogennego źródła aktywacji metabolicznej. Egzogenny układ metabolizujący nie jest w stanie całkowicie naśladować warunków *in vivo*.

8. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć wystąpienia warunków, które mogłyby doprowadzić do zniekształconych wyników dodatnich (tj. do potencjalnej interakcji z układem badawczym) niespowodowanych interakcją między badaną substancją chemiczną a materiałem genetycznym komórki; do takich warunków zalicza się zmiany pH lub osmolalność, interakcje z elementami podłoża (20)(21) bądź zbyt wysokie poziomy cytotoksyczności (22)(23)(24). Cytotoksyczność przekraczającą zalecane górne poziomy cytotoksyczności ustanowione w pkt 28 uznaje się za nadmierną dla badania mysich chłoniaków i badania TK6. Ponadto należy zauważyć, że badane substancje chemiczne będące analogami tymidyny lub zachowujące się jak analogi tymidyny mogą zwiększyć częstość występowania mutacji poprzez selektywny rozwój spontanicznych mutantów w tle w trakcie poddawania komórki działaniu substancji oraz wymagają zastosowania dodatkowych metod badawczych, aby przeprowadzić właściwą ocenę (25).

9. W przypadku wytworzonych nanomateriałów konieczne może być specjalne dostosowanie niniejszej metody badawczej, które jednak nie zostało tu opisane.

10. Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej służącej zbadaniu mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

▼M8

11. Zmutowane komórki charakteryzujące się niedoborem aktywności enzymów kinazy tymidynowej z powodu mutacji $TK^{+/-}$ do $TK^{-/-}$ są odporne na działanie cytostatyczne trifluorotymidyny będącej analogiem pirymidyny. Komórki, w przypadku których odnotowuje się prawidłowy poziom enzymów *TK*, są wrażliwe na trifluorotymidynę, pod wpływem której dochodzi do inhibicji metabolizmu komórkowego i wstrzymania dalszego podziału komórki. Tym samym zmutowane komórki mogą dzielić się w obecności trifluorotymidyny i tworzyć widoczne kolonie, podczas gdy komórki, które zawierają enzymy TK – nie.

ZASADA BADANIA

12. Komórki w zawiesinie są poddawane działaniu badanej substancji chemicznej, zarówno z udziałem lub bez udziału egzogennego źródła aktywacji (zob. pkt 19), przez odpowiedni okres (zob. pkt 33), po czym wydziela się z nich kulturę pochodną, aby oznaczyć poziom cytotoksyczności oraz wywołać ekspresję fenotypową przed wybraniem zmutowanych komórek. Cytotoksyczność określa się poprzez względny wzrost całkowity (zob. pkt 25) w przypadku badania mysich chłoniaków oraz poprzez względny wskaźnik przeżyć (zob. pkt 26) w przypadku badania TK6. Hodowle poddane działaniu substancji są utrzymywane na podłożu przez okres odpowiedni dla każdego wybranego rodzaju komórki (zob. pkt 37), aby doprowadzić do zbliżonej do optymalnej ekspresji fenotypowej wywołanych mutacji. Po uzyskaniu ekspresji fenotypowej oznacza się częstość występowania mutacji, dokonując posiewu określonej liczby komórek na podłożu zawierającym czynnik selektywny w celu wykrycia kolonii zmutowanych komórek oraz na podłożu pozbawionym takiego czynnika selektywnego, aby oznaczyć skuteczność klonowania (żywotność). Kolonie liczy się po upływie odpowiedniego okresu inkubacji. Częstość występowania mutacji oblicza się na podstawie liczby kolonii zmutowanych komórek skorygowanej o wartość wskaźnika skuteczności klonowania w momencie wyboru zmutowanych komórek.

OPIS METODY

Czynności przygotowawcze

Komórki

13. W odniesieniu do badania mysich chłoniaków: Ponieważ badanie mysich chłoniaków opracowano i scharakteryzowano wykorzystując linię $TK^{+/-}$ -3.7.2C należącą do linii komórkowych L5178Y, tę konkretną linię należy zastosować w odniesieniu do badania mysich chłoniaków. Linię komórkową L5178Y uzyskano z chłoniaka grasicy u myszy DBA-2 wywołanego metylocholatrenem (26). Clive i jego współpracownicy poddali komórki L5178Y (które Clive oznaczył jako $TK^{+/+}$ -3) działaniu metanosulfonatu etylu oraz wyizolowali klon $TK^{-/-}$ (oznaczony jako $TK^{-/-}$ -3.7), wykorzystując 5-bromo-2-dezoksyurydynę jako czynnik selektywny. Z klona $TK^{-/-}$ wyizolowano i scharakteryzowano spontanicznego klona $TK^{+/-}$ (oznaczonego jako $TK^{+/-}$ -3.7.2.) i subklona (oznaczonego jako $TK^{+/-}$-3.7.2C) do zastosowania w badaniu mysich chłoniaków (27). Opublikowano kariotyp linii komórkowej (28)(29)(30)(31). Zmienna liczba chromosomów wynosi 40. Istnieje jeden chromosom metacentryczny (t12;13), który należy liczyć jako jeden chromosom. Locus *TK* myszy znajduje się na dystalnym końcu chromosomu 11. Linia komórkowa L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C zawiera mutacje w obu allelach p53 i powoduje mutację białka p53 (32)(33). Status p53 linii komórkowej $TK^{+/-}$-3.7.2C prawdopodobnie odpowiada za zdolność badania do wykrycia uszkodzenia na dużą skalę (17).

14. W odniesieniu do TK6: TK6 to linia ludzkiej komórki limfoblastycznej. Macierzysta linia komórkowa to linia komórkowa zmodyfikowana przez wirus Epsteina-Barra, WI-L2, który pierwotnie uzyskano od 5-letniego samca z dziedziczną sferozytozą. Pierwszy wyizolowany klon, HH4, poddano mutacji za pośrednictwem ICR191 i wygenerowano heterozygotyczną linię komórkową *TK* – TK6(34). Komórki TK6 są niemal diploidalne, a reprezentatywny kariotyp to 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21)(35). Locus ludzkiej *TK* znajduje się na długim ramieniu chromosomu 17. TK6 to linia komórkowa zawierająca białko p53, ponieważ zawiera sekwencję p53 typu dzikiego w obu allelach i opisuje wyłącznie białko p53 typu dzikiego (36).

▼M8

15. Zarówno w przypadku badania mysich chłoniaków, jak i TK6 zaleca się, aby przy pierwszym wyznaczaniu lub uzupełnianiu głównej kultury komórkowej laboratorium badawcze zapewniło brak skażenia mykoplazmą, przeprowadziło analizę chromosomów komórki lub oznaczyło kolorem chromosomy zawierające locus *TK* oraz sprawdziło czas podwojenia populacji. Należy ustalić normalny czas trwania cyklu komórkowego w przypadku komórek wykorzystywanych w laboratorium badawczym, który powinien być zgodny z opublikowanymi właściwościami komórek (16)(19)(37). Główną strukturę komórkową należy przechowywać w temperaturze -150 °C lub niższej i wykorzystywać do przygotowywania wszystkich roboczych kultur komórkowych.

16. Przed ustaleniem dużej liczby kultur roboczych poddanych krioprezerwacji, albo tuż przed wykorzystaniem w doświadczeniu konieczne może być oczyszczenie kultury z wcześniej istniejących zmutowanych komórek [o ile częstość występowania mutacji w kontroli z rozpuszczalnikiem nie osiągnęła już dopuszczalnego zakresu – zob. tabela 2 dotycząca badania mysich chłoniaków]. Osiąga się to, stosując metotreksat (*aminopterynę*), aby dokonać selekcji względem komórek, w których występuje niedobór TK oraz dodając tymidynę, hipoksantynę i glicynę (L5178Y) lub 2-deoksycytydynę (TK6) do kultury w celu zapewnienia optymalnego wzrostu komórek zawierających TK (19)(38)(39) oraz (40) w odniesieniu do TK6. Ogólne porady dotyczące dobrych praktyk w zakresie utrzymania kultury komórkowej, jak również szczegółowe porady w zakresie komórek L5178Y i TK6 znajdują się w pkt (19)(31)(37)(39)(41). Dla laboratoriów wymagających głównych kultur komórkowych do zapoczątkowania badania mysich chłoniaków lub TK6, albo pozyskania nowych głównych kultur komórkowych dostępne jest repozytorium dobrze scharakteryzowanych komórek (37).

Podłoża i warunki hodowli kultur

17. W przypadku obu badań w celu utrzymania kultur należy zastosować odpowiednie podłoże oraz warunki inkubacji (np. naczynia do hodowli komórkowych, wilgotne środowisko o zawartości CO2 wynoszącej 5 %, temperatura inkubacji w wysokości 37 °C). Kultury komórkowe powinny być zawsze utrzymywane w warunkach zapewniających fazę logarytmicznego wzrostu. W tym kontekście szczególne znaczenie ma dobranie podłoża i warunków hodowli kultur w taki sposób, aby zapewnić optymalny wzrost komórek w okresie ekspresji oraz klonowanie zarówno dla komórek zmutowanych, jak i dla komórek niezmutowanych. W przypadku badania mysich chłoniaków i TK6 istotne jest również, aby warunki hodowli kultur zapewniały optymalny wzrost zarówno dużych kolonii / wcześnie pojawiających się mutantów TK, jak i małych kolonii / późno pojawiających się mutantów TK. Więcej szczegółów dotyczących kultury, w tym konieczność właściwego podgrzania surowicy końskiej, jeśli podczas wyboru zmutowanych komórek stosuje się podłoże RPMI znajduje się w pkt (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Przygotowanie kultur

18. Komórki są rozmnażane z kultur wyjściowych i wysiewane na podłoże w takiej gęstości, by hodowle komórek w zawiesinie mogły nadal rosnąć wykładniczo przez okres poddawania działaniu substancji i okres ekspresji.

Aktywacja metaboliczna

19. Egzogenne układy metabolizujące powinny być wykorzystywane w przypadku, gdy stosuje się komórki L5178Y i TK6, ponieważ mają one nieodpowiednią endogenną wydolność metaboliczną. Najpowszechniej stosowanym układem, który jest domyślnie zalecany, jeżeli w danym przypadku nie występują czynniki uzasadniające zastosowanie innego układu, jest frakcja postmitochondrialna suplementowanego kofaktora (S9) przygotowywana z wątrób gryzoni (najczęściej szczurów) poddawanych działaniu substancji indukujących enzymy takich jak Aroclor 1254 (43)(44)(45) lub połączenie fenobarbitalu i β-naftoflawonu (46)(47)(48)(49)(50)(51). Stosowanie tego ostatniego połączenia substancji nie narusza postanowień Konwencji sztokholmskiej w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych (52),

▼M8

przy czym połączenie to okazało się równie skuteczne jak Aroclor 1254 w indukowaniu oksydaz wieloczynnościowych (45)(46)(47)(48)(49). Frakcja S9 jest zazwyczaj wykorzystywana w stężeniach mieszczących się w przedziale 1–2 %, ale stężenie to może zostać zwiększone do 10 % (objętościowo) w końcowym podłożu badawczym. Klasa badanych substancji chemicznych może wywierać wpływ na rodzaj i stężenie stosowanego egzogennego układu metabolizującego lub czynnika pobudzającego metabolizm.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej

20. Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuścić w odpowiednich rozpuszczalnikach oraz – w stosownych przypadkach – rozcieńczyć przed poddaniem komórek ich działaniu (zob. pkt 21). Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym można dodać do układu badawczego bezpośrednio lub rozcieńczyć je przed poddaniem układu badawczego ich działaniu. Badane substancje chemiczne w stanie gazowym lub lotnym należy badać, wprowadzając stosowne modyfikacje w standardowych protokołach, np. poddając układ działaniu substancji w uszczelnionych naczyniach do hodowli komórkowych (53)(54)(55). Preparaty badanej substancji chemicznej należy przygotowywać tuż przed poddaniem komórek jej działaniu, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, że dopuszczalne jest składowanie substancji.

WARUNKI BADANIA

Rozpuszczalniki

21. Rozpuszczalnik powinien zostać dobrany w taki sposób, aby zapewnić optymalną rozpuszczalność badanej substancji chemicznej bez wywierania niepożądanego wpływu na przebieg badania, który może przejawiać się np. zmianą tempa wzrostu komórek, wpływem na integralność badanej substancji chemicznej, wejściem w reakcję z naczyniami do hodowli komórkowych lub zakłóceniem funkcjonowania układu metabolizującego. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć możliwość zastosowania wodnego rozpuszczalnika (lub podłoża). Do sprawdzonych rozpuszczalników zalicza się wodę lub sulfotlenek dimetylu. Zasadniczo zawartość rozpuszczalników organicznych nie powinna przekraczać 1 % (obj.) a zawartość rozpuszczalników wodnych (soli fizjologicznej lub wody) w końcowym podłożu użytym do badania nie powinna przekroczyć 10 % (obj.). W przypadku korzystania z rozpuszczalników innych niż sprawdzone (np. etanolu lub acetonu), decyzja o ich zastosowaniu powinna być uzasadniona danymi potwierdzającymi zgodność tych rozpuszczalników z badanymi substancjami chemicznymi, układem badawczym, a także brak właściwości świadczących o toksyczności genetycznej w zastosowanym stężeniu. W przypadku braku takich danych potwierdzających, należy przeprowadzić dodatkowe kontrole (zob. dodatek 1, definicje), aby wykazać, że wybrany rozpuszczalnik nie wywołuje żadnych szkodliwych ani mutagennych skutków.

DOKONYWANIE POMIARU CYTOTOKSYCZNOŚCI I WYBÓR BADANEGO STĘŻENIA

22. Przy ustalaniu najwyższego stężenia badanej substancji chemicznej należy unikać stężeń, które mogą doprowadzić do uzyskania zniekształconych wyników dodatnich, np. stężeń wywołujących nadmierną cytotoksyczność (zob. pkt 28), wytrącanie substancji w podłożu (zob. pkt 29) lub znaczne zmiany w pH lub osmolalności (zob. pkt 8). Jeżeli badana substancja chemiczna wywołuje znaczną zmianę pH podłoża w momencie jej dodania, poziom pH można skorygować, buforując końcowe podłoże użyte do badania, aby uniknąć zniekształconych wyników dodatnich i utrzymać odpowiednie warunki hodowli kultur.

23. Wyboru stężenia dokonuje się na podstawie poziomu cytotoksyczności oraz innych parametrów (zob. pkt 27–30). Choć dokonanie oceny cytotoksyczności na etapie badania wstępnego może przyczynić się do precyzyjniejszego określenia stężeń, które mają zostać zastosowane w ramach głównego doświadczenia, wykonanie takiego badania wstępnego nie jest wymagane. Nawet w przypadku dokonania wstępnej oceny cytotoksyczności, w ramach głównego doświadczenia należy wykonać ponownie pomiar cytotoksyczności w odniesieniu do każdej kultury. Jeśli przeprowadza się doświadczenie dotyczące zakresu dawkowania, powinno ono obejmować szeroki zakres stężeń i może zostać przerwane 1. dnia po poddaniu działaniu substancji, albo przeprowadzone za pośrednictwem ekspresji trwającej 2 dni i do momentu wybrania zmutowanych komórek (jeżeli okaże się, że zastosowane stężenia są właściwe).

▼**M8**

24. Cytotoksyczność należy określić dla każdej pojedynczej badanej kultury i kultury kontrolnej: metody dotyczące badania mysich chłoniaków (2) oraz TK6 (15) określa praktyka uzgodniona na szczeblu międzynarodowym.

25. Zarówno w przypadku wersji badania mysich chłoniaków wykorzystującej agar, jak i wersji badania mysich chłoniaków wykorzystującej mikropłytki: Ocenę cytotoksyczności należy przeprowadzić, wykorzystując względny wzrost całkowity (RTG), który opracował Clive i Spector w 1975 r. (2) Miernik ten obejmuje względny wzrost zawieszania (RSG: badana kultura w stosunku do kontroli z rozpuszczalnikiem) podczas poddawania komórki działaniu substancji, czas ekspresji i względna skuteczność klonowania (RCE: badana kultura w stosunku do kontroli z rozpuszczalnikiem) w momencie wyboru mutantów (2). Należy zauważyć, że względny wzrost zawieszania obejmuje wszelką utratę komórek mającą miejsce w badanej kulturze podczas poddawania działaniu substancji (zob. dodatek 2 dotyczący wzorów).

26. W odniesieniu do TK6: Ocenę cytotoksyczności należy przeprowadzić w oparciu o względny wskaźnik przeżyć (RS), tj. wskaźnik skuteczności klonowania komórek posianych natychmiast po poddaniu działaniu substancji skorygowany o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji, na podstawie liczby komórek w stosunku do kontroli ujemnych (którym przypisano wskaźnik przeżycia wynoszący 100 %) (odpowiedni wzór zawarto w dodatku 2).

27. Należy ocenić co najmniej cztery badane stężenia (poza kontrolami z rozpuszczalnikiem i kontrolami dodatnimi), które spełniają kryteria dopuszczalności (odpowiednia cytotoksyczność, liczba komórek itp.). Choć zaleca się korzystanie ze zduplikowanych kultur, w odniesieniu do każdego badanego stężenia dopuszcza się możliwość stosowania kontrprób albo pojedynczych kultur poddawanych działaniu substancji. Wyniki uzyskane na podstawie zduplikowanych kultur przy danym stężeniu należy zgłaszać odrębnie, ale dopuszcza się możliwość ich łączenia na potrzeby analizy danych (55). W przypadku badanych substancji chemicznych wykazujących niewielką cytotoksyczność lub niewykazujących cytotoksyczności na ogół odpowiednie będzie zastosowanie 2–3-krotnych przedziałów stężenia. W przypadku wystąpienia cytotoksyczności należy wybrać stężenia, aby obejmowały zakres cytotoksyczności rozpoczynający się od stężenia, które wykazuje cytotoksyczność, jak opisano w pkt 28, oraz uwzględniający stężenia, w których wystąpiła umiarkowana i niewielka cytotoksyczność lub nie wystąpiła żadna cytotoksyczność. W przypadku wielu badanych substancji chemicznych można zaobserwować strome krzywe ilustrujące zależność stężenie-odpowiedź, dlatego też aby uwzględnić cały zakres cytotoksyczności lub szczegółowo zbadać zależność stężenie-odpowiedź, konieczne może okazać się zastosowanie więcej niż czterech stężeń o bardziej zbliżonych wartościach – dotyczy to zwłaszcza przypadków, w których zachodzi konieczność powtórzenia doświadczenia (zob. pkt 70). Stosowanie więcej niż 4 stężeń może mieć szczególnie istotne znaczenie w przypadku korzystania z pojedynczych kultur.

28. Jeżeli maksymalne stężenie określono na podstawie cytotoksyczności, należy dążyć do tego, by poziom takiego maksymalnego stężenia doprowadził do uzyskania względnego wzrostu całkowitego na poziomie od 20 do 10 % w przypadku badania mysich chłoniaków oraz względnego wskaźnika przeżyć na poziomie od 20 do 10 % w przypadku TK6 (pkt 67).

29. W przypadku słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych, które nie wykazują cytotoksyczności w stężeniach niższych od najniższego stężenia nierozpuszczalnego, najwyższy poziom stężenia wykorzystanego w badaniu powinien wywołać zmętnienie lub doprowadzić do wytrącenia się osadu widocznego gołym okiem lub przez mikroskop odwrócony pod koniec poddawania działaniu badanej substancji. Nawet jeżeli cytotoksyczność występuje powyżej najniższego stężenia nierozpuszczalnego, zaleca się przeprowadzenie badania przy zastosowaniu wyłącznie jednego stężenia wywołującego zmętnienie lub skutkującego wytrącaniem się widocznego osadu, ponieważ osad może prowadzić do uzyskania zniekształconych wyników. Ponieważ w badaniu mysich chłoniaków i TK6 stosuje się hodowlę komórek w zawiesinie należy zadbać o to, aby pojawienie się osadu nie zakłóciło przebiegu badania. W tym kontekście pomocne może okazać się również oznaczenie rozpuszczalności w podłożu przed przeprowadzeniem doświadczenia.

▼M8

30. Jeżeli nie zaobserwowano żadnego osadu ani ograniczenia cytotoksyczności, najwyższe badane stężenie powinno odpowiadać 10 mM, 2 mg/ml lub 2 µl/ml, w zależności od tego, która z tych wartości jest najniższa (57) (58). Jeżeli badana substancja chemiczna nie ma określonego składu, np. substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne [tj. substancje chemiczne o nieznanym lub zmiennym składzie (UVCB)], wyciągi pochodzące ze środowiska itp., w przypadku braku dostatecznej cytotoksyczności zwiększenie stężenia poszczególnych składników może wiązać się z koniecznością podwyższenia najwyższego stężenia (np. 5 mg/ml). Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że wymagania te mogą być inne w przypadku produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi (59).

Kontrole

31. Dla każdego warunku doświadczalnego należy włączyć jednoczesne kontrole ujemne (zob. pkt 21) obejmujące sam rozpuszczalnik w podłożu użytym do badania, w odniesieniu do którego podjęto takie same czynności jak w odniesieniu do kultur poddanych działaniu substancji.

32. Jednoczesne kontrole dodatnie są niezbędne do wykazania zdolności danego laboratorium do zidentyfikowania mutagenów w warunkach określonych w stosowanym protokole badania oraz skuteczności egzogennego układu metabolizującego (w stosownych przypadkach), oraz do wykazania właściwego wykrycia zarówno małych / późno pojawiających się mutantów *TK*, jak i dużych / wcześnie pojawiających się mutantów *TK*. Przykładowe substancje służące do kontroli dodatniej przedstawiono w tabeli 1 poniżej. W uzasadnionych przypadkach dopuszcza się możliwość stosowania alternatywnych substancji służących do kontroli dodatniej. Ponieważ testy na komórkach ssaków *in vitro* pod kątem toksyczności genetycznej są w dostatecznym stopniu ustandaryzowane, jeżeli chodzi o krótkoterminowe (3–4 godzinny) poddanie działaniu substancji chemicznej przeprowadzane jednocześnie z udziałem lub bez udziału aktywacji metabolicznej, zastosowanie kontroli dodatniej można ograniczyć do mutagenu wymagającego aktywacji metabolicznej. W takim przypadku wspomniana pojedyncza reakcja kontroli dodatniej potwierdzi zarówno aktywność układu metabolizującego, jak i reaktywność układu badawczego. W przypadku długoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej (tj. 24 godziny bez S9) należy zastosować jednak oddzielną kontrolę dodatnią, ponieważ czas podawania badanej substancji chemicznej będzie się różnił od czasu w badaniu z wykorzystaniem aktywacji metabolicznej. Każdą kontrolę dodatnią należy zastosować przy co najmniej jednym stężeniu, od którego oczekuje się wytworzenia odtwarzalnego oraz wykrywalnego wzrostu wykraczającego poza poziom wyjściowy, w celu wykazania czułości układu badawczego, a reakcja nie powinna być zakłócona cytotoksycznością wykraczającą poza limity określone w niniejszej metodzie badawczej (zob. pkt 28).

Tabela 1

Substancje odniesienia, z których zaleca się korzystać przy przeprowadzaniu oceny biegłości laboratorium i przy dokonywaniu wyboru kontroli dodatnich

Kategoria	Substancja	Numer CAS
1. Mutageny aktywne bez aktywacji metabolicznej		
	Metanosulfonian metylu	66-27-3
	Mitomycyna C	50-07-7
	N-tlenek 4-nitrochinoliny	56-57-5
2. Mutageny wymagające aktywacji metabolicznej		
	Benzo[a]piren	50-32-8
	Cyklofosfamid (jednowodny)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-antracen dimetylobenzenu	57-97-6
	3-Metylocholantren	56-49-5

▼M8

PROCEDURA

Poddanie działaniu badanej substancji chemicznej

33. Rozmnażające się komórki są poddawane działaniu badanej substancji chemicznej z udziałem i bez udziału układu metabolizującego. Narażenie na działanie badanej substancji powinno trwać dostatecznie długo (z reguły przyjmuje się, że odpowiedni okres narażenia na działanie substancji wynosi od 3 do 4 godzin). Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że wymagania te mogą być inne w przypadku produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi (59). Jeżeli chodzi o badanie mysich chłoniaków, w przypadkach, w których krótkoterminowe poddanie działaniu substancji chemicznej daje wyniki ujemne i istnieją dane wskazujące na potrzebę dłuższego poddawania działaniu substancji [np. analogów nukleozydowych, słabo rozpuszczalnych chemikaliów, (5)(59)], należy rozważyć przeprowadzenie badania obejmującego dłuższe poddawanie działaniu substancji, tj. 24 godziny bez S9.

34. Minimalną liczbę komórek wykorzystywanych w odniesieniu do każdej kultury (kontrolnej i poddawanej działaniu substancji) na poszczególnych etapach badania należy ustalić na podstawie wskaźnika spontanicznej częstości występowania mutacji. Co do zasady, zaleca się poddawanie działaniu substancji i pasażowanie takiej liczby komórek w każdej hodowli eksperymentalnej, która będzie wystarczająca do tego, aby utrzymać poziom co najmniej 10, a najlepiej 100, spontanicznie powstałych mutantów na wszystkich etapach badania (poddanie działaniu substancji, ekspresja fenotypowa, wybór mutanta) (56).

35. W przypadku badania mysich chłoniaków zalecana dopuszczalna spontaniczna częstość występowania mutacji znajduje się w przedziale 35–140 × 10^{-6} (wersja wykorzystująca agarem) oraz 50-170 × 10^{-6} (wersja wykorzystująca mikropłytki) (zob. Tabela 2). Aby osiągnąć we wszystkich badanych kulturach poziom co najmniej 10, a najlepiej 100, spontanicznie powstałych mutantów, które przeżywają poddanie działaniu substancji, konieczne jest poddanie działaniu substancji co najmniej 6 × 10^{6} komórek. Poddawanie takiej liczby komórek działaniu substancji i utrzymywanie wystarczającej liczby komórek podczas ekspresji i klonowania do celów wybrania mutanta, zapewnia wystarczającą liczbę spontanicznych mutacji (przynajmniej 10) podczas wszystkich etapów eksperymentu, również w kulturach poddanych działaniu substancji w stężeniach charakteryzujących się cytotoksycznością na poziomie 90 % (określoną za pomocą względnego wzrostu całkowitego na poziomie 10 %) (19)(38)(39).

36. W przypadku badania TK6, spontaniczna częstość występowania mutacji waha się zazwyczaj w przedziale od 2 do 10 × 10^{-6}. Aby osiągnąć we wszystkich badanych kulturach poziom co najmniej 10 spontanicznie powstałych mutantów, konieczne jest poddanie działaniu substancji co najmniej 20 × 10^{6} komórek. Poddawanie takiej liczby komórek działaniu substancji zapewnia wystarczającą liczbę spontanicznie powstałych mutantów (przynajmniej 10) również w kulturach poddanych działaniu substancji w stężeniach charakteryzujących się cytotoksycznością na poziomie 90 % (względny wskaźnik przeżyć wynoszący 10 %). Ponadto w okresie ekspresji należy wyhodować wystarczającą liczbę komórek, a następnie posiać te komórki w celu dokonania wyboru mutantów (60).

Czas ekspresji fenotypowej oraz pomiar cytotoksyczności i częstości występowania mutacji

37. Po zakończeniu okresu poddawania działaniu substancji komórki hoduje się przez określony czas, aby umożliwić niemal optymalną ekspresję fenotypową nowo wywołanych mutacji; specyficzną dla każdej linii komórkowej. W przypadku badania mysich chłoniaków czas ekspresji fenotypowej wynosi 2 dni. Jeżeli chodzi o badanie TK6, czas ekspresji fenotypowej wynosi 3–4 dni. W przypadku zastosowania 24-godzinnego poddania działaniu substancji okres ekspresji rozpoczyna się po zakończeniu poddawania działaniu substancji.

38. W czasie ekspresji fenotypowej komórki zlicza się codziennie. W przypadku badania mysich chłoniaków do obliczania dziennego wzrostu zawieszania wykorzystuje się liczbę komórek w danym dniu. Po 2 dniach ekspresji fenotypowej komórki zawiesza się w podłożu z udziałem lub bez udziału czynnika selektywnego, aby odpowiednio ustalić liczbę mutantów (płytki wyboru) i określić skuteczność klonowania (płytki żywotności). Jeżeli chodzi o badanie mysich chłoniaków, istnieją dwie jednakowo dopuszczalne metody wybierania mutantów za pomocą klonowania; w jednej wykorzystuje się miękki agar, a w drugiej podłoże ciekłe na 96-dołkowych płytkach (19)(38)(39). Klonowanie w przypadku badania TK6 przeprowadza się z wykorzystaniem ciekłego podłoża i 96-dołkowych płytek (16).

▼M8

39. W przypadku mutacji TK jedynym zalecanym czynnikiem selektywnym jest trifluorotymidyna (TFT) (61).

40. W przypadku badania mysich chłoniaków płytki agarowe i mikropłytki zlicza się po 10–12 dniach inkubacji. W przypadku badania TK6 kolonie na mikropłytkach ocenia się po 10–14 dniach pod kątem wcześnie pojawiających się mutacji. Aby uzyskać wolną rosnące (późno pojawiające się) mutacje TK6, należy po policzeniu wcześnie pojawiających się mutacji ponownie nakarmić komórki pożywką i TFT i inkubować płytki przez kolejne 7–10 dni (62). W pkt 42 i 44 przedstawiono argumenty dotyczące zliczania mutacji TK cechujących się powolnym i normalnym wzrostem.

41. Odpowiednie obliczenia dotyczące dwóch badań wykorzystujące te dwie metody (za pomocą agaru i mikropłytek) w przypadku badania mysich chłoniaków znajdują się w dodatku 2. Jeżeli chodzi o metodę wykorzystującą agar do badania mysich chłoniaków, kolonie zlicza się, a liczbę kolonii zmutowanych komórek koryguje się o skuteczność klonowania w celu obliczenia częstości występowania mutacji. W wersji badania mysich chłoniaków i badania TK6 przy wykorzystaniu mikropłytek skuteczność klonowania zarówno w przypadku płytek wyboru, jak i płytek skuteczności klonowania, określa się zgodnie z rozkładem Poissona (63). Częstość występowania mutacji oblicza się na podstawie tych dwóch wartości skuteczności klonowania.

Charakterystyka kolonii zmutowanych komórek

42. W przypadku badania mysich chłoniaków, jeżeli badana substancja chemiczna daje wynik dodatni (zob. pkt 62–63), charakterystykę kolonii za pomocą sortowania według rozmiarów lub wzrostu należy przeprowadzić na przynajmniej jednej z badanych kolonii (najwyższe pozytywne stężenie) oraz na dodatnich i ujemnych kontrolach. Jeżeli wynik badanej substancji chemicznej jest ujemny (zob. pkt 64), charakterystykę kolonii zmutowanych komórek należy przeprowadzić na dodatnich i ujemnych kontrolach. W przypadku metody badania mysich chłoniaków na mikropłytkach mutanty małych kolonii definiuje się jako pokrywające poniżej 25 % średnicy dołka, a mutanty dużych kolonii jako pokrywające powyżej 25 % średnicy dołka. W przypadku metody wykorzystującej agar do zliczania kolonii zmutowanych komórek i sortowania kolonii według rozmiarów używa się licznika kolonii. Informacje szczegółowe na temat podejść do sortowania kolonii według rozmiarów znajdują się w literaturze (19)(38)(40). Do wykazania, że badania przeprowadzono poprawnie, konieczna jest charakterystyka kolonii przeprowadzona na dodatnich i ujemnych kontrolach.

43. Jeżeli wyniku badanej substancji chemicznej nie można uznać za ujemny, jeżeli mutanty zarówno dużych, jak i małych kolonii nie zostaną odpowiednio wykryte w dodatniej kontroli. Charakterystykę kolonii można wykorzystać do przedstawienia ogólnych informacji dotyczących zdolności badanej substancji chemicznej do wywoływania mutacji punktowych lub zdarzeń chromosomowych (pkt 4).

44. TK6: Mutacje rosnące normalnie i powoli rozróżnia się za pomocą różnic w okresie inkubacji (zob. pkt 40). W przypadku badania TK6 zarówno wcześnie jak i późno pojawiające się mutacje ocenia się we wszystkich kulturach, w tym w kontrolach ujemnych i dodatnich. Do wykazania, że badania przeprowadzono poprawnie, konieczna jest charakterystyka kolonii przeprowadzona na ujemnych i dodatnich kontrolach. Wyniku badanej substancji chemicznej nie można uznać za ujemny, jeżeli zarówno wcześnie pojawiające się, jak i późno pojawiające się mutacje nie zostaną odpowiednio wykryte w dodatniej kontroli. Charakterystykę kolonii można wykorzystać do przedstawienia ogólnych informacji dotyczących zdolności badanej substancji chemicznej do wywoływania mutacji punktowych lub zdarzeń chromosomowych (pkt 4).

▼M8

Biegłość laboratorium

45. Aby można było wykazać, że dane laboratorium dysponuje dostatecznym doświadczeniem w zakresie przeprowadzania badań przed wykorzystaniem go do przeprowadzenia rutynowego badania, laboratorium to musiało przeprowadzić szereg doświadczeń, podczas których stosowano substancje odniesienia służące do kontroli z wykorzystaniem różnych mechanizmów (co najmniej jedna substancja aktywna i jedna substancja aktywna przy braku aktywacji metabolicznej spośród substancji wymienionych w tabeli 1) oraz różnych kontroli ujemnych (uwzględniając kultury niepoddane działaniu substancji chemicznej oraz różne rozpuszczalniki/nośniki). Reakcje otrzymane w wyniku takiej kontroli dodatniej i ujemnej powinny odpowiadać reakcjom opisanym w literaturze. Wymóg ten nie dotyczy laboratoriów, które dysponują odpowiednim doświadczeniem, tj. laboratoriów prowadzących bazę danych historycznych, o której mowa w pkt 47–50. W przypadku badania mysich chłoniaków wartości otrzymane zarówno w wyniku kontroli dodatnich i ujemnych powinny być zgodne z zaleceniami międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych (*International Workshops on Genotoxicity Testing*) (zob. Tabela 2).

46. Aby wykazać biegłość w zakresie wykrywania mutagennych substancji chemicznych, ustalania skuteczności układu metabolizującego i wykazywania odpowiedniości warunków wzrostu komórek poddawanych działaniu substancji, ekspresji fenotypowej i wyboru mutantów oraz procedur oceny punktowej należy zbadać szereg substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej (zob. tabela 1) przy krótkoterminowym i długoterminowym poddawaniu działaniu substancji chemicznej (w przypadku stosowania długoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej) przy braku aktywacji metabolicznej oraz przy krótkoterminowym poddawaniu działaniu substancji chemicznej w obecności aktywacji metabolicznej. Należy dobrać zakres stężeń wybranych substancji tak, aby uzyskać powtarzalne i powiązane ze stężeniem wzrosty powyżej tła w celu wykazania czułości i zakresu oznaczania układu badawczego.

Dane historyczne dotyczące kontroli

47. Laboratorium powinno ustalić:

— zakres i rozkład historycznych wyników kontroli dodatniej,

— zakres i rozkład historycznych wyników kontroli ujemnej (bez poddania działaniu substancji chemicznej, z rozpuszczalnikiem).

48. Przy pierwszym gromadzeniu danych dotyczących rozkładu historycznych wyników kontroli ujemnej wyniki jednoczesnej kontroli ujemnej powinny być zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli ujemnej. W miarę dodawania kolejnych danych doświadczalnych do rozkładu kontroli jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla tego rozkładu (64)(65).

49. Prowadzona przez dane laboratorium baza danych historycznych dotyczących kontroli ujemnych powinna początkowo zawierać dane z co najmniej 10 doświadczeń, a najlepiej z co najmniej 20 doświadczeń przeprowadzonych w porównywalnych warunkach doświadczalnych. Laboratoria powinny stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (65)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych dotyczących kontroli dodatniej i ujemnej oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest »pod kontrolą« (66). Więcej informacji szczegółowych i zaleceń dotyczących sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych można znaleźć w literaturze (64).

50. Dane dotyczące kontroli ujemnej powinny obejmować częstość występowania mutacji w pojedynczej kulturze lub, najlepiej, w zduplikowanych kulturach, jak opisano w pkt 27. Jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla rozkładu danych zawartych w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej. W przypadku gdy dane dotyczące kontroli ujemnej nie mieszczą się w granicy kontrolnej wyznaczającej przedział 95 %, włączenie ich do rozkładu kontroli historycznej może być dopuszczalne, pod warunkiem że dane te nie stanowią skrajnych obserwacji nietypowych, istnieją dowody świadczące o tym, iż dany układ badawczy znajduje się „pod kontrolą” (zob. pkt 48), a także dowody wykluczające błąd techniczny czy ludzki.

▼M8

51. Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem ich spójności z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wszelkie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Przedstawienie wyników

52. Zarówno w przypadku badania mysich chłoniaków, jak i badania TK6, przedstawienie danych powinno zgodnie z poniższym opisem uwzględniać – zarówno w odniesieniu do kultur, które zostały poddane działaniu substancji oraz kultur kontrolnych – dane niezbędne do obliczenia cytotoksyczności (odpowiednio względny wzrost całkowity i względny wskaźnik przeżyć) oraz częstości występowania mutacji.

53. W przypadku badania mysich chłoniaków należy dostarczyć dane dotyczące poszczególnych kultur określające względny wzrost zawieszania, względny wzrost całkowity, skuteczność klonowania w momencie wybierania mutantów oraz liczbę kolonii zmutowanych komórek (w wersji wykorzystującej agar) lub liczbę pustych dołków (w wersji wykorzystującej mikropłytki). Częstość występowania mutacji powinna być wyrażona jako liczba zmutowanych komórek na milion komórek przeżywających. Jeżeli reakcja daje wynik dodatni, należy podać częstość występowania mutacji w małych i dużych koloniach (lub procent częstości występowania mutacji) w odniesieniu do przynajmniej jednego stężenia substancji badanej (zazwyczaj najwyższe pozytywne stężenie) oraz do ujemnych i dodatnich kontroli. Jeżeli reakcja daje wynik ujemny, należy podać częstość występowania mutacji w małych i dużych koloniach w odniesieniu do ujemnych i dodatnich kontroli.

54. W przypadku badania TK6 należy dostarczyć dane dotyczące poszczególnych kultur określające względny wskaźnik przeżyć, skuteczność klonowania w momencie wybierania mutantów oraz liczbę pustych dołków w odniesieniu do wcześnie i późno pojawiających się mutacji. Częstość występowania mutacji powinna być wyrażona jako liczba zmutowanych komórek na milion komórek przeżywających i powinna obejmować zarówno całkowitą częstość występowania mutacji, jak i częstość występowania wcześnie i późno pojawiających się mutacji (lub procent częstości występowania mutacji).

Kryteria dopuszczalności

55. Zarówno w przypadku badania mysich chłoniaków, jak i badania TK6, przed ustaleniem ogólnych wyników dotyczących danej badanej substancji chemicznej należy spełnić następujące kryteria:

— Przeprowadzono dwa warunki doświadczalne (krótkoterminowe poddanie działaniu substancji z udziałem i bez udziału aktywacji metabolicznej – zob. pkt 33) do momentu uzyskania w jednym z nich wyników dodatnich.

— Należy poddać analizie wystarczającą liczbę komórek i stężeń (zob. pkt 27, 34–36).

— Kryteria wyboru najwyższego stężenia są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 28–30.

Kryteria dopuszczalności dotyczące ujemnych i dodatnich kontroli

56. W wyniku przeprowadzenia przez grupę roboczą ekspertów ds. badania mysich chłoniaków w ramach międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych (International Workshops on Genotoxicity Testing) analizy szerokiego zakresu danych dotyczących badania mysich chłoniaków powstało uzgodnione stanowisko na temat szczegółowych kryteriów dopuszczalności dotyczących badania mysich chłoniaków (1)(2)(3)(4)(5). W związku z tym w ramach niniejszej metody badawczej przedstawiono szczegółowe zalecenia dotyczące ustalania dopuszczalności kontroli ujemnych i dodatnich oraz oceny wyników dotyczących poszczególnych substancji w ramach badania mysich chłoniaków. Baza danych dotyczących badania TK6 jest dużo mniejsza i grupa robocza nie przeprowadziła jego oceny.

▼M8

57. W przypadku badania mysich chłoniaków każdy eksperyment należy poddać ocenie pod kątem sprawdzenia, czy kontrola niepoddawana działaniu substancji / z rozpuszczalnikiem spełnia kryteria dopuszczalności grupy roboczej ds. badania mysich chłoniaków międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych ((4) i tabela 2 poniżej) dotyczące: (1) częstości występowania mutacji (należy zauważyć, że częstość występowania mutacji dopuszczalna przez międzynarodowe warsztaty z badań genotoksycznych jest różna w wersjach badania mysich chłoniaków z wykorzystaniem agaru i mikropłytek), (2) skuteczności klonowania w momencie wybierania mutantów oraz (3) wzrostu zawieszania (wzory znajdują się w dodatku 2).

Tabela 2

Kryteria dopuszczalności dotyczące badania mysich chłoniaków

Parametr	Metoda badania na miękkim agarze	Metoda badania na mikropłytkach
Częstość występowania mutacji	35–140 × 10^{-6}	50–170 × 10^{-6}
Skuteczność klonowania	65–120 %	65–120 %
Wzrost zawiesiny	8–32 -krotne (3–4 godziny poddawania działaniu substancji) 32–180 -krotne (24 godziny poddawania działaniu substancji, jeżeli będzie stosowane)	8–32 -krotne (3–4 godziny poddawania działaniu substancji) 32–180 -krotne (24 godziny poddawania działaniu substancji, jeżeli będzie stosowane)

58. W przypadku badania mysich chłoniaków każde badanie należy również poddać ocenie pod kątem sprawdzenia, czy dodatnia(-e) kontrola(-e) spełniają co najmniej jedno z następujących kryteriów dopuszczalności opracowanych przez grupę roboczą międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych:

— Kontrola dodatnia powinna wskazywać bezwzględny wzrost całkowitej częstości występowania mutacji, tzn. przekroczenie poziomu spontanicznej częstości występowania mutacji w tle [indukowana częstość występowania mutacji (IMF)] o co najmniej 300 × 10^{-6}. Co najmniej 40 % indukowanej częstości występowania mutacji powinno zostać odzwierciedlone w częstości występowania mutacji w małych koloniach.

— W dodatniej kontroli odnotowano wzrost częstości występowania mutacji w małych koloniach na poziomie co najmniej 150 × 10^{-6} powyżej wzrostu odnotowanego w jednoczesnej kontroli niepoddawanej działaniu substancji / z rozpuszczalnikiem (indukowana częstość występowania mutacji w małych koloniach na poziomie 150 × 10^{-6}).

59. W przypadku TK6 badanie będzie dopuszczalne, jeżeli uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących jednoczesnej kontroli ujemnej do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej, jak opisano w pkt 48–49. Jednoczesne kontrole dodatnie (zob. pkt 32) powinny ponadto wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną.

60. W obu badaniach górna granica cytotoksyczności zaobserwowanej w kulturze kontroli dodatniej powinna być taka sama, jak w kulturach eksperymentalnych. Oznacza to, że względny wzrost całkowity / względny wskaźnik przeżyć nie powinny być niższe niż 10 %. Aby wykazać spełnienie kryteriów dopuszczalności w odniesieniu do kontroli dodatniej, wystarczy zastosować jedno stężenie (lub jedno ze stężeń kultur w ramach kontroli dodatniej, jeżeli zastosowanie więcej niż jedno stężenie). Częstość występowania mutacji w kontroli dodatniej musi się ponadto zmieścić w dopuszczalnym zakresie ustalonym dla danego laboratorium.

Ocena i interpretacja wyników

61. W przypadku badania mysich chłoniaków grupa robocza ekspertów ds. mysich chłoniaków międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych wykonała ogromną pracę dotyczącą biologicznego znaczenia i kryteriów reakcji dodatniej. W związku z tym w niniejszej metodzie badawczej przedstawiono szczegółowe zalecenia na

▼M8

temat interpretacji wyników dotyczących badanej substancji chemicznej uzyskanych w badaniu mysich chłoniaków (zob. pkt 62–64). Baza danych dotyczących badania TK6 jest dużo mniejsza i grupa robocza nie przeprowadziła jego oceny. W związku z tym zalecenia na temat interpretacji danych dotyczących TK6 przedstawiono w bardziej ogólnej formie (zob. pkt 65–66). Do obu badań mają zastosowanie dodatkowe zalecenia (zob. pkt 67–71).

Badanie mysich chłoniaków

62. Aby zagwarantować, że zwiększona częstość występowania mutacji ma biologiczne znaczenie, zaleca się zastosowanie metody określania reakcji dodatnich i ujemnych. Zamiast stosowanej zazwyczaj w innych badaniach analizy statystycznej, metoda ta polega na wykorzystaniu predefiniowanej indukowanej częstości występowania mutacji (tj. wzrostu częstości występowania mutacji powyżej poziomu w ramach jednoczesnej kontroli) określanej jako globalny czynnik oceny (*Global Evaluation Factor*), który opiera się na analizie rozkładu danych dotyczących częstości występowania mutacji w kontroli ujemnej otrzymanych od laboratoriów uczestniczących (4). W wersji badania mysich chłoniaków wykorzystującej agar, globalny czynnik oceny wynosi 90×10^{-6}, w wersji badania mysich chłoniaków wykorzystującej mikropłytki globalny czynnik oceny wynosi 126×10^{-6}.

63. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli w dowolnych ze zbadanych warunków doświadczalnych (zob. pkt 33), wzrost częstości występowania mutacji powyżej jednoczesnego tła przekracza globalny czynnik oceny i jest powiązany ze stężeniem (np. z zastosowaniem testu tendencji). Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za zdolną do wywołania mutacji w danym układzie badawczym.

64. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych (zob. pkt 33) nie zachodzi reakcja powiązana ze stężeniem lub, jeżeli ma miejsce wzrost częstości występowania mutacji – nie przekracza globalnego czynnika oceny. Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za niezdolną do wywołania mutacji w danym układzie badawczym.

TK6

65. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli w dowolnych ze zbadanych warunków doświadczalnych (zob. pkt 33):

— co najmniej jedno z badanych stężeń wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,

— ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany ze stężeniem (zob. pkt 33)

— którykolwiek z wyników znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicą kontrolną wyznaczającą przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 48).

W przypadku gdy wszystkie wspomniane kryteria są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna jest w stanie wywołać mutacje w danym układzie badawczym. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można znaleźć w literaturze (66)(67).

66. O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych (zob. pkt 33):

— żadne z badanych stężeń nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z równoczesną kontrolą ujemną,

— ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany ze stężeniem,

▼M8

— wszystkie wyniki mieszczą się w rozkładzie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 48).

Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za niezdolną do wywołania mutacji w danym układzie badawczym.

Zarówno w przypadku badania mysich chłoniaków i badania TK6:

67. Jeżeli maksymalne stężenie określono na podstawie cytotoksyczności, należy dążyć do tego, by poziom takiego maksymalnego stężenia doprowadził do uzyskania względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć na poziomie od 20 do 10 %. Istnieje zgoda co do tego, że należy zachować ostrożność podczas interpretowania wyników dodatnich występujących jedynie między 20 i 10 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć, a wyniku nie uznaje się za dodatni, jeżeli wzrost częstości występowania mutacji nastąpił tylko na poziomie lub poniżej 10 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć (jeżeli podlegał ocenie) (2)(59).

68. W niektórych okolicznościach dodatkowe informacje mogą okazać się pomocne w ustaleniu, czy badana substancja chemiczna nie jest mutagenna, kiedy w żadnej z kultur nie odnotowuje się wartości względnego wzrostu całkowitego między 10–20 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć. Są to następujące sytuacje: (1) Nie ma objawów mutagenności (np. brak zależności dawka-odpowiedź, brak częstości występowania mutacji wyższych niż zaobserwowane w jednoczesnej kontroli ujemnej lub w historycznych zakresach tła itp.) w szeregu punktów danych w zakresie 100–20 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć, a co najmniej jeden punkt danych znajduje się w zakresie 20–25 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć. (2) Nie ma objawów mutagenności (np. brak zależności dawka-odpowiedź, brak częstości występowania mutacji wyższych niż zaobserwowane w jednoczesnej kontroli ujemnej lub w historycznych zakresach tła itp.) w szeregu punktów danych w zakresie 100–25 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć, a jeden punkt danych jest ujemny i jego wartość wynosi niewiele poniżej 10 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć. W obu tych sytuacjach można stwierdzić, że badana substancja chemiczna daje wynik ujemny.

69. Weryfikacja jednoznacznie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

70. Jeżeli reakcja nie jest ani wyraźnie dodatnia, ani wyraźnie ujemna, jak opisano powyżej, oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku, dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub wyniki dalszych badań. Przydatne może być powtórne przeprowadzenie doświadczenia, potencjalnie z zastosowaniem zmienionych warunków doświadczalnych [np. z zastosowaniem odstępów czasu między stężeniami w celu zwiększenia prawdopodobieństwa uzyskania punktów danych w zakresie 10–20 % względnego wzrostu całkowitego / względnego wskaźnika przeżyć, wykorzystując inne warunki aktywacji metabolicznej (tj. stężenie S9 lub pochodzenie S9) oraz czas poddawania działaniu substancji chemicznej].

71. W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne. W takiej sytuacji należy uznać, że reakcja badanej substancji chemicznej jest niejednoznaczna (tj. może zostać zinterpretowana zarówno jako dodatnia, jak i jako ujemna).

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

72. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli jest dostępny;

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;

— rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane;

▼**M8**

— pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, stosownie do przypadku.

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, stosownie do przypadku i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Rozpuszczalnik:

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika;

— zawartość procentowa rozpuszczalnika w końcowym podłożu.

Komórki:

W przypadku głównych kultur laboratoryjnych:

— rodzaj i źródło komórek oraz historia w laboratorium badawczym;

— cechy kariotypu lub zmienna liczba chromosomów;

— metody utrzymywania kultur komórkowych;

— brak mykoplazmy;

— czasy podwojenia komórek.

Warunki badania:

— uzasadnienie wyboru stężeń oraz liczby kultur komórkowych; z uwzględnieniem np. danych dotyczących cytotoksyczności oraz granic rozpuszczalności;

— skład podłoża, stężenie CO_2, poziom wilgotności;

— stężenie badanej substancji chemicznej wyrażone jako stężenie końcowe w podłożu (np. µg lub mg/ml lub mM podłoża);

— stężenie (lub objętość) rozpuszczalnika i badanej substancji chemicznej dodanych do podłoża;

— temperatura inkubacji;

— okres inkubacji;

— czas poddawania działaniu substancji chemicznej;

— zagęszczenie komórek w trakcie poddawania działaniu substancji;

▼**M8**

— typ oraz skład układu metabolizującego (źródło frakcji S9, metoda przygotowania preparatu frakcji S9, stężenie lub objętość preparatu frakcji S9 i frakcji S9 w końcowym podłożu, kontrole jakości frakcji S9);

— substancje służące do kontroli dodatniej i ujemnej, stężenia końcowe w poszczególnych warunkach poddawania działaniu substancji chemicznej;

— długość okresu ekspresji (w tym liczba posianych komórek i podkultur oraz – w stosownych przypadkach – schematy żywienia);

— nazwa czynnika selektywnego i jego stężenie;

— w przypadku badania mysich chłoniaków należy wskazać zastosowaną wersję badania (agar lub mikropłytki)

— kryteria dopuszczalności badań;

— metody wykorzystywane do wyliczenia liczby żywotnych i zmutowanych komórek;

— metody wykorzystywane do pomiaru cytotoksyczności;

— wszelkie informacje uzupełniające istotne w kontekście cytotoksyczności i stosowanej metody;

— czas trwania okresów inkubacji po posiewie;

— definicja kolonii, których rozmiary oraz typy są brane pod uwagę (łącznie z kryteriami dotyczącymi „małych” oraz „dużych” kolonii, w stosownych przypadkach);

— kryteria uznawania wyników badań za dodatnie, ujemne lub niejednoznaczne;

— metody stosowane w celu ustalenia poziomu pH, osmolalności, jeżeli jest badana i strącania, w stosownych przypadkach.

Wyniki:

— liczba komórek poddanych działaniu substancji chemicznej i liczba komórek w hodowli pochodnej z każdej kultury;

— parametry toksyczności (względny wzrost całkowity w przypadku badania mysich chłoniaków i względny wskaźnik przeżyć w przypadku badania TK6);

— oznaki strącania i czas oznaczenia;

— liczba komórek posianych na podłożu selektywnym i nieselektywnym;

— liczba kolonii na podłożu nieselektywnym i liczba odpornych kolonii na podłożu selektywnym oraz powiązane częstości występowania mutacji;

— sortowanie według rozmiarów w przypadku dodatnich i ujemnych kontroli oraz jeżeli badana substancja chemiczna daje wynik dodatni, przy co najmniej jednym stężeniu, oraz powiązane częstości występowania mutacji;

— w stosownych przypadkach zależność stężenie-odpowiedź;

— dane dotyczące jednoczesnych kontroli ujemnych (z rozpuszczalnikiem) i dodatnich (stężenia i rozpuszczalniki);

— dane dotyczące historycznych kontroli ujemnych (z rozpuszczalnikiem) i dodatnich (stężenia i rozpuszczalniki) z uwzględnieniem zakresów, średnich i odchyleń standardowych; liczba badań, na których oparto kontrole historyczne;

▼M8

— analizy statystyczne (dla poszczególnych kultur oraz, w stosownych przypadkach, połączonych kontrprób) oraz p-wartości, jeżeli występują; oraz w przypadku badania mysich chłoniaków ocena globalnego czynnika oceny.

Omówienie wyników

Wniosek

BIBLIOGRAFIA

(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. i 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." nr 35 (3), s. 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. i Stankowski, L.F. Jr. (2002). *Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures*, *New Orleans, Louisiana* (kwiecień 2000) „Environ. Mol. Mutagen." nr 40 (4), s. 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. i Yoshimura, I. (2003). *Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report*, „Mutation Res." nr 540, s. 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. i 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." nr 47 (1), s. 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. i 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." nr 627 (1), s. 36–40.

(6) OECD (2016). *Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015.* [W:] Publikacje na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny nr 234. Paryż: OECD.

(7) M.D. Fellows, T. Luker, A. Cooper i M.R. O'Donovan (2012). *Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors.* „Mutation, Res." nr 746 (1), s. 21–28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. i Hayashi, M. (2001). *Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction.* „Mutation Res." nr 493 (1–2), s. 101–114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. i Moore, M.M. (2009). *The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy*, „Toxicol. Sci." nr 109 (1), s. 96–105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., i Hozier, J.C. (1990). *Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells*. „Proc. National. Academy. Sci. USA" nr 87 (1), s. 51–55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. i Clive, D. (1981). *Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK$^{+/-}$ Leads to TK$^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System*, „Mutation Res." nr 84 (1), s. 169–181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. i Moore, M.M. (1985). *Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK$^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History*, „Mutation Res." nr 147 (5), s. 237–242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. i Sawyer, J. (1985). *Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells.* „Mutation, Res." nr 151 (1), s. 161–174.

(14) Liber H.L., Call K.M. i Little J.B. (1987). *Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells.* „Mutation, Res." nr 178 (1), s. 143–153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. i Little J.B. (1992). *Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells In Vitro*. „Somat. Cell Mol. Genet." nr 18 (1), s. 77–87.

(16) Honma M., Hayashi M. i Sofuni T. (1997). *Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells.* „Mutation. Res." nr 374 (1), s. 89–98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. i Hayashi, M. (2000). *Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity.* „Mol. Carcinogen." nr 28 (4), s. 203–14.

(18) Amundson S.A. i 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." nr 267 (1), s. 89–95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. i Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro Mouse Lymphoma (L5178Y TK$^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay.* [W:] *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan i M. Bajpayee (red.), Springer Protocols, Humana Press, s. 27–50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. i 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." nr 634 (1–2), s. 177–183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. i Marzin, D. (2008). *Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid*. „Environ. Mol. Mutagen." nr 49 (6), s. 439–452.

(22) Brusick D. (1986). *Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations.* „Environ. Mutagen." nr 8 (6), s. 879–886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. i Okumura, K. (1992). *Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells*. „Mutation Res." nr 268 (2), s. 297–305.

▼**M8**

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. i Myhr, B.C. (1991). *Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9.* „Mutation Res." nr 257, s. 147–204.

(25) Wang J., Heflich R.H. i 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." nr 626 (1–2), s. 185–190.

(26) Fischer, G.A. (1958). *Studies on the Culture of Leukemic Cells In Vitro.* „Ann. N.Y. Academy Sci." nr 76: s. 673–680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. i Brown, M.M.M. (1979). *Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System.* „Mutation Res." nr 59 (1), s. 61–108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. i Hozier, J. (1985). *Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK$^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line*, „Mutation Res." nr 147 (5), s. 243–253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. i Hozier J.C. (1989). *High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line*, „Mutation Res." nr 214 (2), s. 181–193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. i Moore, M.M. (2006). *Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK$^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line*, „Environ. Mol. Mutagen." nr 47 (2), s. 127–131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. i 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." nr 55 (1), s. 35–42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. i 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." nr 373 (2), s. 157–165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. i 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." nr 19 (4), s. 263–268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. i 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." nr 84 (2), s. 411–416.

(35) Honma M. (2005). *Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells.* „Environ. Mol. Mutagen." nr 45 (2–3), s. 162–176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. i 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." nr 55 (1), s. 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*. (Tekst w przygotowaniu).

(38) Lloyd M. i Kidd D. (2012). *The Mouse Lymphoma Assay.* [W:] *Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods*. Parry i Parry (red.), Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, s. 35–54.

(39) Mei N., Guo X. i Moore M.M. (2014). *Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity.* [W:] *Optimization in Drug Discover*: *In Vitro Methods,* Z Yan i Caldwell (red.), wydanie drugie, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. i Thilly W.G. (1982). *Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts.* „Mutation Res." nr 94 (2), s. 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. i Stokes, W. (2005). *Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice.* ATLA nr 33 (3), s. 261–287.

(42) Moore M.M. i Howard B.E. (1982). *Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium*, „Mutation Res." nr 104 (4–5): s. 287–294.

(43) Ames B.N., McCann J. i Yamasaki E. (1975). *Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test.* „Mutation Res." nr 31 (6), s. 347–364.

(44) Maron D.M. i Ames B.N. (1983). *Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test*. „Mutation Res." nr 113 (3–4), s. 173–215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. i 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." nr 37 (1), s. 83–90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. i Ishidate M. Jr. (1979). *Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In Vitro.* „Mutation Res." nr 66 (3): s. 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." nr 4 (1), s. 55–65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. i Wolf, R.C. (1992). *Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays.* „Mutagen." nr 7 (3), s. 175–177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. i Sugimura, T. (1976). *A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems*, [W:] *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*. F.J. de Serres *et al.* (red.). North-Holland: Elsevier, s. 85–88.

▼**M8**

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). *Report from Working Group on In Vitro Tests for Chromosomal Aberrations.* „Mutation Res.” nr 312 (3), s. 241–261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. i 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.” nr 28 (1), s. 51–59.

(52) UNEP (2001). Konwencja sztokholmska w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych, Program Narodów Zjednoczonych ds. Ochrony Środowiska (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. i McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. [W:] *Genotoxic Effects of Airborne Agents,* R.R. Tice, D.L. Costa i K.M. Schaich (red.). Nowy Jork, Plenum, s. 91–103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. i Brooks, A.L. (1983). *for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay.* „Environ. Mutagen.” nr 5 (6), s. 795–801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. i Matsushima, T. (2008). *An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay.* „Mutation Res.” nr 652 (2), s. 122–130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). *Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation*, [W:] *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D.J. Kirkland (red.), CambridgeUniversity Press, s. 66–101.

(57) Morita T., Honma M. i 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.” nr 741 (1–2), s. 32–56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. i Levy D.D. (2013). *Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay.* „Environ. Mol. Mutagen.” nr 54 (1), s. 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.* Dostępne na stronie internetowej: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. i 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.”, nr 52 (5), s. 373–384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. i 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.” nr 85 (5), s. 363–378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. i 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.” nr 216 (1), s. 9–17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. i Rand, W.M. (1981). *Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates.* „Anal. Biochem.” nr 110 (1), s. 1–8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. i Thybaud, V. (2011). *Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data.* „Mutation Res.” nr 723 (2), s. 87–90.

▼**M8**

(65) Ryan T.P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement.* Nowy Jork: John Wiley and Sons, wydanie drugie.

(66) OECD (2014). *Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 199. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(67) Fleiss J.L., Levin B. i Paik M.C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, wydanie trzecie, Nowy Jork: John Wiley & Sons.

▼M8

Dodatek 1

DEFINICJE

Aneugen: Każda substancja chemiczna lub proces, który poprzez reakcję z elementami mitotycznego i mejotycznego cyklu podziału komórek prowadzi do aneuploidii w komórkach lub organizmach.

Aneuploidia: Wszelkie odchylenia od zwykłej diploidalnej (lub haploidalnej) liczby chromosomów w pojedynczym chromosomie lub w większej ich liczbie, ale nie w całym zestawie lub w całych zestawach chromosomów (poliploidalność).

Mutageny powodujące substytucję: Substancje chemiczne, które powodują podstawienie par zasad w DNA.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Skuteczność klonowania: odsetek komórek posiewanych z niską gęstością, będących w stanie przekształcić się w zdatną do zliczenia kolonię.

Klastogen: Każda substancja chemiczna lub proces, które powodują strukturalne aberracje chromosomowe w populacjach komórek lub organizmów.

Cytotoksyczność: W odniesieniu do badań objętych niniejszą metodą badawczą, cytotoksyczność określa się jako obniżenie względnego wzrostu całkowitego w przypadku badania mysich chłoniaków lub względnego wskaźnika przeżyć w przypadku badania TK6.

Mutacja pierwotna: Mutacja genu z rodzaju macierzystego do mutanta, który powoduje zmianę lub stratę aktywności enzymatycznej funkcji zakodowanego białka.

Mutageny typu zmiany fazy odczytu: Substancje chemiczne, które powodują dodanie lub delecję pojedynczej pary zasad lub wielu par zasad w cząstce DNA.

Genotoksyczny: Termin ogólny, obejmujący wszystkie rodzaje uszkodzeń DNA lub chromosomu, w tym przerwy, przegrupowania adduktów, mutacje, aberracje chromosomowe i aneuploidię. Nie wszystkie rodzaje skutków genotoksycznych powodują mutacje lub stałe uszkodzenia chromosomu.

Rekombinacja mitotyczna: Zachodząca podczas mitozy rekombinacja między chromatydami homologicznymi, której możliwe skutki to indukowanie pęknięć łańcucha DNA lub utrata heterozygotyczności.

Mutagenny: Powoduje dziedziczne zmiany w sekwencji lub sekwencjach par zasad DNA w genach lub w strukturze chromosomów (aberracje chromosomowe).

Częstość występowania mutacji (MF): Liczba zaobserwowanych zmutowanych komórek podzielona przez liczbę komórek zdolnych do życia.

Czas ekspresji fenotypowej: Czas po poddaniu działaniu substancji chemicznej, w którym zmiana genetyczna utrwalana jest w genomie, a wszelkie istniejące wcześniej produkty genu są oddzielane do tego stopnia, że zmianie ulega cecha fenotypowa.

Względny wskaźnik przeżyć (RS): Względny wskaźnik przeżyć wykorzystuje się do mierzenia cytotoksyczności związanej z poddawaniem działaniu substancji chemicznej w badaniu TK6. Stanowi względną skuteczność klonowania komórek posianych natychmiast po poddaniu działaniu substancji, skorygowany o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji w stosunku do skuteczności klonowania w kontroli ujemnej.

▼M8

Względny wzrost zawieszania (RSG): W przypadku badania mysich chłoniaków względny, całkowity, dwudniowy wzrost zawieszania badanej kultury w porównaniu z całkowitym dwudniowym całkowitym dwudniowym wzrostem zawieszania w kontroli ujemnej / kontroli z rozpuszczalnikiem (Clive i Spector, 1975). Względny wzrost zawieszania powinien obejmować względny wzrost badanej kultury w porównaniu z kontrolą ujemną / kontrolą z rozpuszczalnikiem w trakcie okresu poddawania działaniu substancji.

Względny wzrost całkowity (RTG): Względny wzrost całkowity wykorzystuje się do mierzenia cytotoksyczności związanej z poddawaniem działaniu substancji chemicznej w badaniu mysich chłoniaków. Jest to miara względnego (w stosunku do grupy kontrolnej nośnika) wzrostu badanych kultur w trakcie etapów badania poddawania działaniu substancji, dwudniowej ekspresji i wybierania mutantów za pomocą klonowania. Względny wzrost zawieszania każdej badanej kultury mnoży się przez względną skuteczność klonowania badanej kultury w momencie wybierania mutantów oraz wyraża się go w odniesieniu do skuteczności klonowania w kontroli ujemnej / kontroli z rozpuszczalnikiem (Clive i Spector, 1975).

Frakcje S9 uzyskane z wątroby: Supernatant z homogenatu wątroby po odwirowaniu przy 9 000 g, tj. surowy ekstrakt z wątroby.

Preparat frakcji S9: Preparat złożony z frakcji S9 uzyskanej z wątroby i kofaktorów niezbędnych do aktywności metabolicznej enzymów.

Wzrost zawieszania (SG): Wielokrotny wzrost liczby komórek w trakcie etapów poddawania działaniu substancji i ekspresji w badaniu mysich chłoniaków. Wzrost zawieszania oblicza się poprzez pomnożenie wielokrotnego wzrostu na dzień 1 przez wielokrotny wzrost na dzień 2 w przypadku krótkoterminowego (3–4 h) poddawania działaniu substancji. W przypadku zastosowania 24-godzinnego poddania działaniu substancji wzrost zawieszania stanowi wielokrotny wzrost podczas 24-godzinnego poddawania działaniu substancji pomnożony przez wartości wielokrotnego wzrostu w 1. i 2. dniu ekspresji.

Kontrola z rozpuszczalnikiem: ogólny termin opisujący kultury kontrolne otrzymujące wyłącznie rozpuszczalnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Kontrole niepoddawane działaniu substancji: Kontrolne niepoddawane działaniu substancji są to kultury, które nie są poddawane działaniu żadnej substancji (tj. ani badanej substancji chemicznej, ani rozpuszczalnika), lecz które są przetwarzane taki sam sposób jako hodowle otrzymujące badaną substancję chemiczną.

▼M8

Dodatek 2

WZORY

Cytotoksyczność

W przypadku obu wersji badania mysich chłoniaków (wykorzystującej agar i wykorzystującej mikropłytki)

Cytotoksyczność określa się jako względny wzrost całkowity (RTG), który obejmuje względny wzrost zawieszania (RSG) podczas dwudniowego okresu ekspresji oraz względną skuteczność klonowania (RCE) uzyskaną w momencie wybierania mutantów. Względny wzrost całkowity, względny wzrost zawieszania oraz względną skuteczność klonowania wyraża się jako procent.

Obliczanie względnego wzrostu zawieszania: Pierwsza wartość wzrostu zawieszania (SG_1) to szybkość wzrostu między dniem 0 a dniem 1 (stężenie komórek na dzień 1 / stężenie komórek na dzień 0), a druga wartość wzrostu zawieszenia (SG_2) to szybkość wzrostu między dniem 1 a dniem 2 (stężenie komórek na dzień 2 / stężenie komórek na dzień 1). Względny wzrost zawieszania to całkowity wzrost zawieszania (SG_1 x SG_2) dla danej kultury poddawanej działaniu substancji w porównaniu z kontrolą niepoddawaną działaniu substancji / kontroli z rozpuszczalnikiem. Czyli: RSG = [$SG_{1(test)}$ x $SG_{2(test)}$] / [$SG_{1(control)}$ x $SG_{2(control)}$] SG_1 należy obliczyć na podstawie wstępnego stężenia komórek zastosowanego na początku poddawania komórek działaniu substancji. Pozwala to uwzględnić wszelką różnicową cytotoksyczność, która występuje w badanych kulturach w trakcie poddawania komórek działaniu substancji chemicznej.

Względna skuteczność klonowania to względna skuteczność klonowania badanej kultury w porównaniu ze względną skutecznością klonowania w kontroli ujemnej / kontroli z rozpuszczalnikiem uzyskaną w momencie wybierania mutantów.

Względny wzrost całkowity (RTG): RTG = RSG x RCE

TK6

Względny wskaźnik przeżyć (RS):

Ocenę cytotoksyczności przeprowadza się w oparciu o względny wskaźnik przeżyć, tj. wskaźnik skuteczności klonowania komórek posianych natychmiast po poddaniu działaniu substancji, skorygowany o wszelkie komórki utracone w trakcie działania substancji w stosunku do skuteczności klonowania w kontrolach ujemnych (którym przypisano wskaźnik przeżycia wynoszący 100 %). Dostosowanie z tytułu utraty komórek podczas poddawania działaniu substancji można obliczyć następująco:

$$\text{Dostosowana SK} = \text{SK} \times \frac{\textit{Liczba komórek pod koniec okresu narażenia}}{\textit{Liczba komórek na początku okresu narażenia}}$$

Względny wskaźnik przeżyć kultury poddanej działaniu badanej substancji chemicznej oblicza się w następujący sposób:

$$RS = \frac{\textit{Dostosowana SK wkulturze poddanej działaniu}}{\textit{Dostosowana SK wkontroli zrozpuszczalnikiem}} \times 100$$

Częstość występowania mutacji zarówno w badaniu mysich chłoniaków, jak i badaniu TK6

Częstość występowania mutacji (MF) to skuteczność klonowania kolonii zmutowanych komórek w podłożu selektywnym (CE_m) skorygowana o skuteczność klonowania w podłożu nieselektywnym w momencie wybierania mutantów (CE_V). Czyli, MF = CE_M/CE_V Poniżej opisano obliczenia tych dwóch wartości skuteczności klonowania w metodzie klonowania z wykorzystaniem agaru i metodzie klonowania z wykorzystaniem mikropłytek.

▼**M8**

Wersja badania mysich chłoniaków z wykorzystaniem agaru: W wersji badania mysich chłoniaków z wykorzystaniem miękkiego agaru, liczbę kultur na płytce wyboru mutantów (C_M) oraz liczbę kultur na płytce niewybranych lub skuteczności klonowania (liczba zdolnych do życia)(C_V) uzyskuje się dzięki bezpośredniemu zliczeniu klonów. Jeżeli umieszczono 600 komórek na płytkach skuteczności klonowania (CE), wybierania mutantów (CE_M) i płytkach niewybranych lub skuteczności klonowania (liczba zdolnych do życia)(C_V), a 3×10^6 komórek wykorzystano do wybierania mutantów,

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

Wersja badania mysich chłoniaków i TK6 wykorzystująca mikropłytki: W wersji badania mysich chłoniaków wykorzystującej mikropłytki C_M i C_V określa się jako wynik całkowitej liczby mikropłytek (TW) i prawdopodobnej liczby kultur na płytkę (P) na mikropłytkach.

$C_M = P_M \times TW_M$

$CV = P_V \times TW_V$

Poczynając od wyrazu zerowego rozkładu Poissona (Furth i in., 1981), P uzyskuje się z

$P = - \ln (EW / TW)$

Gdzie EW oznacza puste dołki, a TW wszystkie dołki. W związku z tym

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$

W wersji badania mysich chłoniaków na mikropłytkach częstości występowania mutacji w małych i dużych koloniach oblicza się w ten sam sposób, wykorzystując odpowiednią liczbę pustych dołków dla małych i dużych kolonii.

W przypadku badania TK6 częstości występowania mutacji w małych i dużych koloniach są oparte na wcześnie pojawiających się i późno pojawiających się mutacjach.

▼M8

B.68 **METODA BADAWCZA IN VITRO KRÓTKIEGO OKRESU NARAŻENIA DO CELÓW IDENTYFIKACJI i) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH POWODUJĄCYCH POWAŻNE USZKODZENIE OCZU ORAZ ii) SUBSTANCJI CHEMICZNYCH, KTÓRE NIE WYMAGAJĄ ZAKLASYFIKOWANIA JAKO SUBSTANCJE DRAŻNIĄCE OCZY LUB POWODUJĄCE POWAŻNE USZKODZENIE OCZU.**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 491 (2017). Metoda badania krótkiego okresu narażenia (STE) jest metodą badawczą *in vitro*, którą można stosować w niektórych okolicznościach i przy określonych ograniczeniach na potrzeby klasyfikacji pod względem zagrożeń i oznakowania substancji chemicznych (substancji i mieszanin) powodujących poważne uszkodzenie oczu, jak również substancji chemicznych, które nie wymagają klasyfikacji jako powodujące poważne uszkodzenie lub podrażnienie oczu, określonych przez Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ) (1) oraz rozporządzenie Unii Europejskiej (WE) nr1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (rozporządzenie CLP) ([1]).

2. Potencjalne działanie substancji chemicznych szkodliwe dla oczu oceniano przez wiele lat przede wszystkim za pomocą badania na oku królika *in vivo* (metoda badawcza B.5 (8), równoważna z wytyczną OECD TG 405). Powszechnie uznaje się, że w dającej się przewidzieć przyszłości żadne pojedyncze alternatywne badanie *in vitro* nie będzie w stanie w pełni zastąpić badania na oku królika *in vivo* na potrzeby prognozowania pełnego zakresu działania drażniącego różnych klas chemicznych. Jest jednak możliwe, że strategiczne połączenia alternatywnych metod badawczych przeprowadzonych w ramach (zintegrowanej) strategii badań będą mogły w pełni zastąpić badanie na oku królika (2). Podejście odgórne opracowano na potrzeby badania substancji chemicznych, w przypadku których można oczekiwać w oparciu o istniejącą wiedzę, że posiada wysoki potencjał działania drażniącego lub spowodowania poważnego uszkodzenia oczu. Z kolei podejście oddolne opracowano na potrzeby badania substancji chemicznych, w przypadku których można oczekiwać w oparciu o istniejącą wiedzę, że nie spowoduje podrażnienia oczu w stopniu wymagającym zaklasyfikowania. Chociaż uważa się, że metoda badawcza krótkiego okresu narażenia nie może całkowicie zastąpić badania na oku królika *in vivo*, jest odpowiednia do stosowania w ramach zintegrowanej strategii badań do celów regulacyjnej klasyfikacji i oznakowania, np. w podejściu odgórnym/oddolnym, do identyfikacji bez dalszych badań (i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) oraz (ii) substancji chemicznych (z wyjątkiem wysoce lotnych substancji i wszystkich substancji chemicznych w stanie stałym, które nie są środkami powierzchniowo czynnymi), które nie wymagają klasyfikacji jako powodujące poważne uszkodzenie lub podrażnienie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) (1)(2). Konieczne będzie jednak przeprowadzenie dodatkowego badania w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której nie przewidziano, że spowoduje poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) lub której nie zaklasyfikowano do grupy substancji oznaczonej jako „brak kategorii" wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP (nie powoduje poważnego uszkodzenia lub podrażnienia oczu) w ramach metody badawczej krótkiego okresu narażenia, w celu ustanowienia ostatecznej klasyfikacji. Ponadto przed zastosowaniem metody badawczej krótkiego okresu narażenia w ramach podejścia oddolnego zgodnie z systemami klasyfikacji innymi niż GHS ONZ / rozporządzeniem CLP należy skonsultować się z odpowiednimi organami regulacyjnymi. Na wybór najbardziej odpowiedniej metody badawczej i zastosowanie niniejszej metody badawczej należy patrzeć w kontekście wytycznych OECD w sprawie zintegrowanych podejść do badań i oceny dotyczących poważnych uszkodzeń i podrażnień oczu (14).

3. Niniejsza metoda badawcza ma na celu opisanie procedur stosowanych do oceny potencjalnego działania szkodliwego dla oczu badanej substancji chemicznej na podstawie jej potencjału wywoływania cytotoksyczności w metodzie badawczej krótkiego okresu

([1]) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

▼M8

narażenia. Cytotoksyczny wpływ substancji chemicznych na komórki nabłonka rogówki stanowi istotny sposób działania wywołujący uszkodzenie nabłonka rogówki i podrażnienie oka. Żywotność komórek ocenia się w ramach metody badawczej krótkiego okresu narażenia za pomocą pomiaru ilościowego – po ekstrakcji z komórek – niebieskiej soli formazanu, wytworzonej w żywych komórkach metodą enzymatycznej konwersji barwnika przyżyciowego MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy) (3). Uzyskaną w ten sposób żywotność komórek porównuje się do kontroli z rozpuszczalnikiem (względna żywotność) i wykorzystuje do oszacowania potencjalnego działania szkodliwego dla oczu badanej substancji chemicznej. Badaną substancje chemiczną klasyfikuje się jako substancję kategorii 1 wg GHZ ONZ / rozporządzenia CLP, jeżeli zarówno stężenia 5 % i 0,05 % prowadzą do żywotności komórek niższej niż lub równej (≤) 70 %. Z drugiej strony przewiduje się, że substancja chemiczna zalicza się do grupy substancji „brak kategorii" wg GHZ ONZ / rozporządzenia CLP, jeżeli zarówno stężenia 5 % i 0,05 % prowadzą do żywotności komórek wyższej niż (>) 70 %.

4. Termin „badana substancja chemiczna" jest używany w niniejszej metodzie badawczej w odniesieniu do badanej substancji, i nie jest powiązany z zastosowaniem metody badawczej krótkiego okresu narażenia do badania substancji lub mieszanin. Definicje znajdują się w dodatku.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

5. Niniejsza metoda badawcza bazuje na protokole opracowanym przez Kao Corporation (4), który został poddany dwóm różnym badaniom walidacyjnym: jednemu, które zostało przeprowadzone przez Komitet Walidacyjny Japońskiego Towarzystwa ds. Rozwiązań Alternatywnych Wobec Eksperymentów na Zwierzętach (JSAAE) (5) i drugiemu, które zostało przeprowadzone przez Japońskie Centrum ds. Uznawania Metod Alternatywnych (JaCVAM) (6). Wzajemna ocena została przeprowadzona przez NICEATM/ICCVAM na podstawie treści sprawozdań z zastosowania metody badawczej oraz dokumentów przeglądowych poświęconych metodzie badawczej (7).

6. W przypadku wykorzystania metody badawczej krótkiego okresu narażenia do identyfikacji substancji chemicznych (substancji i mieszanin) na 125 substancjach chemicznych (zarówno substancjach, jak i mieszaninach) powodujących poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) metoda ta wykazuje ogólną dokładność na poziomie 83 % (104/125), odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie 1 % (1/86) oraz odsetek wyników fałszywie ujemnych na poziomie 51 % (20/39) w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badań na oku królika *in vivo* (7). Uzyskany odsetek wyników fałszywie ujemnych nie ma decydującego znaczenia w tym kontekście, ponieważ wszystkie badane substancje chemiczne, które charakteryzują się żywotnością komórek ≤ 70 % przy stężeniu 5 % i > 70 % przy stężeniu 0,05 %, byłyby następnie badane za pomocą innych odpowiednio zwalidowanych metod badawczych *in vitro*, lub – w ostateczności – w ramach badania na oku królika *in vivo*, w zależności od obowiązujących wymogów regulacyjnych oraz zgodnie ze strategią badań sekwencyjnych oraz aktualnie zalecanymi podejściami bazującymi na analizie wagi dowodów (1)(8). Badaniu poddano głównie substancje jednoskładnikowe, chociaż istnieje również ograniczona ilość danych dotyczących badania mieszanin. Niniejsza metoda badawcza ma jednak zastosowanie techniczne w odniesieniu do badania zarówno substancji wieloskładnikowych, jak i mieszanin. Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy jednak zastanowić się nad tym, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli istnieje wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny. Zastosowanie metody badawczej krótkiego okresu narażenia w celu zidentyfikowania badanej substancji chemicznej jako substancji kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP nie ujawniło żadnych innych konkretnych niedociągnięć. Osoby przeprowadzające badanie mogą rozważyć zastosowanie niniejszej metody badawczej w odniesieniu do badanych substancji chemicznych, wskutek czego żywotność komórek ≤ 70 % zarówno przy stężeniu 5 %, jak i przy stężeniu 0,05 %, należy zaakceptować jako wskazującą na reakcję wywołującą poważne uszkodzenie oczu, w którym to przypadku należy daną substancję zaklasyfikować do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP bez dalszych badań.

▼M8

7. W przypadku wykorzystania metody badawczej krótkiego okresu narażenia do identyfikacji substancji chemicznych (substancji i mieszanin) na 130 substancjach chemicznych (zarówno substancjach, jak i mieszaninach), które nie muszą zostać sklasyfikowane jako powodujące podrażnienie i poważne uszkodzenie oczu (tj. brak kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP), metoda ta wykazuje ogólną dokładność na poziomie 85 % (110/130), odsetek wyników fałszywie ujemnych na poziomie 12 % (9/73) oraz odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie 19 % (11/57) w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badań na oku królika *in vivo* (7). W przypadku wykluczenia wysoce lotnych substancji i substancji stałych innych niż środki powierzchniowo czynne ze zbioru danych, ogólna dokładność wzrasta do 90 % (92/102), odsetek wyników fałszywie ujemnych do 2 % (1/54), a odsetek wyników fałszywie dodatnich do 19 % (9/48)(7). W rezultacie potencjalne niedociągnięcia związane ze stosowaniem metody badawczej krótkiego okresu narażenia w celu zidentyfikowania badanych substancji chemicznych, które nie wymagają sklasyfikowania jako substancje powodujące podrażnienie i poważne uszkodzenie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP), obejmują wysoki odsetek wyników fałszywie ujemnych w przypadku (i) wysoce lotnych substancji charakteryzujących się prężnością par powyżej 6 kPa i (ii) stałych substancji chemicznych (substancji i mieszanin) innych niż środki powierzchniowo czynne i mieszaniny, w których skład wchodzą wyłącznie środki powierzchniowo czynne. Takie substancje chemiczne są wykluczone z dziedziny zastosowania metody badawczej krótkiego okresu narażenia (7).

8. Poza substancjami chemicznymi, o których mowa w pkt 6 i 7, zbiór danych wygenerowany wskutek zastosowania metody badawczej krótkiego okresu narażenia zawiera również dane z badań wewnętrznych przeprowadzonych na 40 mieszaninach, które – w porównaniu z testem działania drażniącego na oko *in vivo* wg Draize'a – wykazały dokładność na poziomie 88 % (35/40), odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie 50 % (5/10) oraz odsetek wyników fałszywie ujemnych na poziomie 0 % (0/30), do celów potencjalnego zidentyfikowania mieszanin niewymagających sklasyfikowania w ramach systemów klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP (9). Dlatego też metodę badawczą krótkiego okresu narażenia można stosować w celu zidentyfikowania mieszanin jako mieszanin nieprzypisanych do żadnej kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP w ramach podejścia oddolnego, z wyjątkiem mieszanin w postaci stałej innych niż mieszaniny składające się wyłącznie ze środków powierzchniowo czynnych z uwagi na rozszerzenie stosowanego ograniczenia na substancje stałe. Ponadto mieszaniny, w których skład wchodzą substancje o prężności par przekraczającej 6 kPa, powinny być ocenianie w taki sposób, aby zagwarantować uniknięcie potencjalnych przypadków zaniżenia prognoz, przy czym w takiej sytuacji odpowiednie uzasadnienie należy sporządzać stosownie do specyfiki danego przypadku.

9. Metody badawczej krótkiego okresu narażenia nie można stosować do identyfikacji badanych substancji chemicznych jak substancji należących do kategorii 2 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP lub do kategorii 2A (podrażniające oczy) lub 2B (delikatnie podrażniające oczy) wg GHS ONZ z uwagi na znaczną liczbę substancji chemicznych należących do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP, które wskutek zaniżenia prognoz są klasyfikowane jako należące do kategorii 2, 2A lub 2B wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP, oraz znaczną liczbę substancji chemicznych nieprzypisanych do żadnej kategorii, które z uwagi na zawyżenie prognoz są klasyfikowane jako należące do kategorii 2, 2A lub 2B (7). W tym celu konieczne może być przeprowadzenie dodatkowego badania, z wykorzystaniem innej odpowiedniej metody.

10. Metoda badawcza krótkiego okresu narażenia jest odpowiednia dla badanych substancji chemicznych, które zostały rozpuszczone lub jednolicie zawieszone przez co najmniej 5 minut w soli fizjologicznej, 5 % roztworze sulfotlenku dimetylu w soli fizjologicznej lub oleju mineralnym. Metoda badawcza krótkiego okresu narażenia nie jest odpowiednia dla nierozpuszczalnych badanych substancji chemicznych ani dla badanych substancji chemicznych, które nie mogą zostać jednolicie zawieszone przez co najmniej 5 minut w soli fizjologicznej, 5 % roztworze sulfotlenku dimetylu w soli fizjologicznej lub oleju mineralnym. Stosowanie oleju mineralnego w ramach metody badawczej krótkiego okresu narażenia uznaje się za dopuszczalne z uwagi na krótki okres narażenia. Dlatego też metodę badawczą krótkiego okresu narażenia uznaje się za odpowiednią do przewidywania potencjalnego działania szkodliwego dla oczu nierozpuszczalnych w wodzie badanych substancji chemicznych (np. alkoholi tłuszczowych o długich łańcuchach lub ketonów), o ile są one mieszalne z co najmniej jednym z trzech zaproponowanych powyżej rozpuszczalników (4).

▼M8

11. Termin „badana substancja chemiczna” jest używany w niniejszej metodzie badawczej w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania ([1]), i nie jest powiązany z zastosowaniem metody badawczej krótkiego okresu narażenia do badania substancji lub mieszanin.

ZASADA BADANIA

12. Metoda badawcza krótkiego okresu narażenia to test *in vitro* bazujący na cytotoksyczności, który przeprowadza się na zlewającej się warstwie komórek rogówki królika spreparowanej przez Statens Seruminstitut (SIRC) hodowanej na 96-dołkowej poliwęglanowej mikropłytce (4). Po pięciominutowym okresie narażenia na działanie badanej substancji chemicznej przeprowadza się ilościowy pomiar cytotoksyczności rozumianej jako względna żywotność komórek SIRC w ramach badania MTT (4). Obniżona żywotność komórek jest wykorzystywana do przewidywania potencjalnych działań niepożądanych, które mogą doprowadzić do uszkodzenia oczu.

13. Zgromadzone informacje wskazują, że 80 % roztworu zakroplonego do oka królika jest wydalane za pośrednictwem worka spojówkowego w okresie od trzech do czterech minut, podczas gdy ponad 80 % roztworu zakroplonego do oka człowieka jest wydalane w okresie od jednej minuty do dwóch minut (10). Metoda badawcza krótkiego okresu narażenia ma na celu zbliżenie wartości tych okresów narażenia i wykorzystanie cytotoksyczności w charakterze punktu końcowego służącego ocenieniu skali uszkodzenia komórek SIRC po pięciominutowym okresie narażenia na oddziaływanie badanej substancji chemicznej.

WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

14. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania metody badawczej krótkiego okresu narażenia opisanej w niniejszej metodzie badawczej laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo klasyfikując jedenaście substancji wskazanych w tabeli 1. Wspomniane substancje dobrano w taki sposób, by reprezentowały pełne spektrum reakcji na poważne uszkodzenie oczu lub podrażnienie oczu w oparciu o wyniki badań na oku królika *in vivo* (wytyczna TG 405) oraz system klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP (1). Przy wyborze substancji chemicznej kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością tych substancji na rynku, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz dostępnością wysokiej jakości danych z badań *in vitro* uzyskanych dzięki zastosowaniu metody badawczej krótkiego okresu narażenia (3). Jeżeli figurująca w wykazie substancja jest niedostępna lub jeżeli będzie to uzasadnione, dopuszcza się możliwość zastosowania innej substancji, dla której dostępne są odpowiednie dane referencyjne z badań *in vivo* i *in vitro*, pod warunkiem zastosowania tych samych kryteriów co kryteria opisane w tym miejscu.

Tabela 1

Wykaz substancji służących do wykazania biegłości

Substancja	Numer CAS	Klasa chemiczna ([1])	Stan skupienia	Kategoria ([2]) badania *in vivo* według klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP	Rozpuszczalnik w badaniu przeprowadzanym zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia	Kategoria badania przeprowadzanego zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia według klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP
Chlorek bezalkoniowy (10 %, roztwór wodny)	8 001-54-5	Związek oniowy	Ciecz	Kategoria 1	Sól fizjologiczna	Kategoria 1
Triton X-100 (100 %)	9 002-93-1	eter	Ciecz	Kategoria 1	Sól fizjologiczna	Kategoria 1

([1]) W czerwcu 2013 r. na posiedzeniu wspólnym uzgodniono, że – w przypadkach, w których będzie to możliwe – w nowych, zaktualizowanych metodach badawczych należy bardziej konsekwentnie stosować termin „badana substancja chemiczna” w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania.

▼**M8**

Substancja	Numer CAS	Klasa chemiczna ([1])	Stan skupienia	Kategoria ([2]) badania *in vivo* według klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP	Rozpuszczalnik w badaniu przeprowadzanym zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia	Kategoria badania przeprowadzanego zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia według klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP
Czerwień kwasowa 92	18 472-87-2	Związek heterocykliczny; związek bromu; związek chloru	Stały	Kategoria 1	Sól fizjologiczna	Kategoria 1
Wodorotlenek sodu	1 310-73-2	Zasada; nieorganiczna substancja chemiczna	Stały	Kategoria 1 ([3])	Sól fizjologiczna	Kategoria 1
Butyrolakton	96-48-0	Lakton; związek heterocykliczny	Ciecz	Kategoria 2A (kategoria 2 zgodnie z rozporządzeniem CLP)	Sól fizjologiczna	Nie można przewidzieć
1-oktanol	111-87-5	alkohol	Ciecz	Kategoria 2A/B ([4]) (kategoria 2 zgodnie z rozporządzeniem CLP)	Olej mineralny	Nie można przewidzieć
Cyklopentanol	96-41-3	Alkohol; węglowodór cykliczny	Ciecz	Kategoria 2A/B ([5]) (kategoria 2 zgodnie z rozporządzeniem CLP)	Sól fizjologiczna	Nie można przewidzieć
Octan 2-etoksyetylu	111-15-9	Alkohol; eter	Ciecz	Brak kategorii	Sól fizjologiczna	Brak kategorii
Dodekan	112-40-3	Węglowodór acykliczny	Ciecz	Brak kategorii	Olej mineralny	Brak kategorii
Keton metylowo-izobutylowy	108-10-1	Keton	Ciecz	Brak kategorii	Olej mineralny	Brak kategorii

▼M8

Substancja	Numer CAS	Klasa chemiczna (1)	Stan skupienia	Kategoria (2) badania *in vivo* według klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP	Rozpuszczalnik w badaniu przeprowadzanym zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia	Kategoria badania przeprowadzanego zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia według klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP
Siarczan 1,1-dimetyloguanidyny	598-65-2	Amidyna; związek siarki	Stały	Brak kategorii	Sól fizjologiczna	Brak kategorii

(1) Klasy chemiczne przyporządkowano na podstawie informacji zamieszczonych we wcześniejszych publikacjach NICEATM, a w przypadku braku takich publikacji – na podstawie systemu klasyfikacji Medical Subject Headings (MeSH®) opracowanego przez National Library of Medicine (za pośrednictwem ChemIDplus® [National Library of Medicine] dostępnego na stronie internetowej http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) oraz na podstawie ustaleń dotyczących struktury poczynionych przez NICEATM.

(2) Na podstawie wyników badania na oku królika *in vivo* (wytyczna OECD TG 405) i z zastosowaniem GHS ONZ / rozporządzenia CLP (1).

(3) Przypisano do kategorii 1 z uwagi na potencjał działania żrącego na skórę 100 % roztworu wodorotlenku sodu (wymienionego jako substancja chemiczna przeznaczona do oceny biegłości w wytycznej OECD TG 435) oraz z uwagi na kryterium ustanowione dla substancji kategorii 1 wg GHS ONZ/rozporządzenia CLP (1).

(4) Zaklasyfikowanie do kategorii 2A lub 2B zależy od interpretacji kryterium GHS ONZ dotyczącego rozróżnienia tych dwóch kategorii, tj. 2 spośród 6 zwierząt lub 4 spośród 6 zwierząt, u których w dniu 7. odnotowano skutki niezbędne do zakwalifikowania substancji chemicznej do kategorii 2A. Zbiór danych dotyczących badań *in vivo* obejmuje 2 badania – każde z nich odbyło się z udziałem 3 zwierząt. W jednym badaniu u dwóch spośród trzech zwierząt w 7. dniu odnotowano skutki niezbędne do zakwalifikowania substancji chemicznej do kategorii 2A (11), podczas gdy w drugim badaniu wszystkie punkty końcowe u wszystkich trzech zwierząt zupełnie ustały do 7. dnia, dzięki czemu można było zaklasyfikować je do kategorii 2B (12).

(5) Zaklasyfikowanie do kategorii 2A lub 2B zależy od interpretacji kryterium GHS ONZ dotyczącego rozróżnienia tych dwóch kategorii, tj. 1 spośród 3 zwierząt lub 2 spośród 3 zwierząt, u których w dniu 7. odnotowano skutki niezbędne do zakwalifikowania substancji chemicznej do kategorii 2A. W badaniu *in vivo* brały udział 3 zwierzęta. Wszystkie punkty końcowe poza zmętnieniem rogówki i zaczerwienieniem spojówki u jednego zwierzęcia zupełnie ustały do dnia 7. lub wcześniej. Jedno ze zwierząt, u którego skutki działania substancji nie ustały do 7. dnia, miało zmętnienie rogówki na poziomie 1 i zaczerwienienie spojówki na poziomie 1 (w dniu 7.), które ustały w pełni w dniu 14 (11).

Skróty: Nr CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service.

PROCEDURA

Przygotowanie jednowarstwowej hodowli komórek

15. Do badania przeprowadzanego zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia należy wykorzystywać linię komórkową rogówki królika SIRC. Zaleca się, aby komórki SIRC były pozyskiwane z dobrze przygotowanego banku komórek, takiego jak zbiór kultur typu amerykańskiego CCL60.

16. Komórki SIRC hoduje się w kolbie z kulturami zawierającej minimalne niezbędne podłoże Eagle'a uzupełnione 10 % roztworem bydlęcej surowicy płodowej, 2 mM L-glutaminy, 50–100 jednostkami/ml penicyliny i 50–100 µg/ml streptomycyny w temperaturze 37 °C, przy stężeniu CO_2 poniżej 5 % i w wilgotnym środowisku. Komórki, które zlały się w kolbie z kulturami, powinny zostać odseparowane za pomocą roztworu trypsyny i kwasu wersenowego, potencjalnie przy wykorzystaniu skrobaka do komórek. Komórki rozmnaża się (np. 2–3 pasaże) w kolbie z kulturami przed ich poddaniem rutynowym badaniom, przy czym od momentu ich rozmrożenia nie powinny być one poddane więcej niż 25 pasażom.

17. Komórki gotowe do ich poddania badaniu przeprowadzanemu zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia są następnie przygotowywane przy zachowaniu odpowiedniego zagęszczenia i posiewane na płytkach 96-dołkowych. Zalecane zagęszczenie posiewu komórek wynosi $6{,}0 \times 10^3$ komórek na dołek, jeżeli komórki mają zostać wykorzystane po upływie czterech dni od dnia ich posiania, lub $3{,}0 \times 10^3$ komórek na dołek, jeżeli komórki mają zostać wykorzystane po upływie pięciu dnia od dnia ich posiania, przy objętości kultur wynoszącej 200 µl. Komórki wykorzystywane w badaniu przeprowadzanym zgodnie z metodą badawczą krótkiego okresu narażenia posiane na podłożu przy zachowaniu odpowiedniego zagęszczenia posiewu osiągną poziom konfluencji przekraczający 80 % w momencie przeprowadzenia badania, tj. po upływie czterech lub pięciu dni od posiewu.

Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej

18. Preferowanym rozpuszczalnikiem do rozcieńczania badanych substancji chemicznych lub tworzenia zawiesiny z tych substancji jest sól fizjologiczna. Jeżeli badana substancja chemiczna charakteryzuje się niską rozpuszczalnością lub nie

▼M8

może zostać rozpuszczona ani jednolicie zawieszona przez co najmniej pięć minut w soli fizjologicznej, jako rozpuszczalnik drugiego wyboru wykorzystuje się 5 % roztwór sulfotlenku dimetylowego (nr CAS 67-68-5) w soli fizjologicznej. Jeżeli badane substancje chemiczne nie mogą zostać rozpuszczone ani jednolicie zawieszone przez co najmniej pięć minut w soli fizjologicznej ani w 5 % roztworze sulfotlenku dimetylowego w soli fizjologicznej, jako rozpuszczalnik trzeciego wyboru wykorzystuje się olej mineralny (nr CAS 8042-47-5).

19. Badane substancje chemiczne rozpuszcza się lub zawiesza się jednolicie w wybranym rozpuszczalniku w stężeniu 5 % (w/w), po czym rozcieńcza się je w ramach seryjnego procesu 10-krotnego rozcieńczania do stężenia 0,5 % i 0,05 %. Każda badana substancja chemiczna musi zostać zbadana zarówno przy stężeniu 5 %, jak i przy stężeniu 0,05 %. Komórki hodowane na płytce 96-dołkowej są poddawane działaniu 200 µl roztworu (lub zawiesiny) badanej substancji chemicznej w stężeniu 5 % albo 0,05 % na dołek przez okres pięciu minut w temperaturze pokojowej. Badane substancje chemiczne (substancje jednoskładnikowe lub substancje wieloskładnikowe lub mieszaniny) uznaje się za czyste substancje oraz substancje rozcieńczone lub zawieszone zgodnie z tą metodą, niezależnie od ich czystości.

20. Podłoże opisane w pkt 16 wykorzystuje się w odniesieniu do każdej płytki i każdego powtórzenia jako podłoże na potrzeby badania. Ponadto w ramach każdego powtórzenia komórki we wszystkich dołkach poddaje się również działaniu próbek kontroli z rozpuszczalnikiem. W przypadku rozpuszczalników wymienionych w pkt 18 potwierdzono, że nie wywierają one żadnego szkodliwego wpływu na żywotność komórek SIRC.

21. W ramach metody badawczej krótkiego okresu narażenia należy korzystać z 0,01 % roztworu dodecylo siarczanu sodu w soli fizjologicznej jako kontroli dodatniej w odniesieniu do każdej płytki przy każdym powtórzeniu. Aby obliczyć żywotność komórek w kontroli dodatniej, każda płytka w ramach każdego powtórzenia musi również zawierać kontrolę z rozpuszczalnikiem w postaci soli fizjologicznej.

22. Przeprowadzenie próby ślepej jest konieczne w celu ustalenia poziomu korekty z tytułu gęstości optycznej; próbę taką powinno się przeprowadzić na dołkach zawierających wyłącznie sól fizjologiczną buforowaną fosforanami, bez wapniu i magnezu (PBS) ani komórek.

23. Każda próbka (badana substancja chemiczna w stężeniu 5 % i 0,05 %, kontrola podłoża, kontrola z rozpuszczalnikiem i kontrola dodatnia) powinna zostać zbadana trzykrotnie w ramach każdego powtórzenia poprzez narażenie komórek na oddziaływanie 200 µl odpowiedniej badanej lub kontrolnej substancji chemicznej przez okres pięciu minut w temperaturze pokojowej.

24. Substancje wzorcowe są przydatne do oceny potencjalnego działania drażniącego dla oczu nieznanych chemikaliów z określonej klasy chemicznej lub produktowej lub do oceny względnego potencjalnego działania drażniącego substancji drażniącej dla oczu w określonym zakresie reakcji w postaci podrażnienia.

Pomiar żywotności komórek

25. Po narażeniu na działanie substancji komórki przemywa się dwukrotnie 200 µl PBS i dodaje się do nich 200 µl roztworu MTT (0,5 mg MTT / ml podłoża). Po upływie dwugodzinnego czasu reakcji w inkubatorze (37 °C, 5 % CO_2) roztwór MTT dekantuje się po czym ekstrahuje się z niego formazan, dodając 200 µl roztworu 0,04 N kwasu chlorowodorowego – izopropanolu przez 60 minut bez dostępu światła w temperaturze pokojowej, po czym dokonuje się pomiaru absorbancji roztworu formazanu w MTT przy 570 nm za pomocą czytnika płytek. Do interferencji badanych substancji chemicznych w teście MTT (wywołanej barwnikami lub bezpośrednimi reduktorami MTT) dochodzi wyłącznie w przypadku zatrzymania znacznej ilości badanej substancji chemicznej w układzie badawczym po zakończeniu płukania po okresie narażenia – do takiej sytuacji może dojść w przypadku tkanek ludzkiej rogówki zrekonstruowanej w trójwymiarze lub zrekonstruowanego ludzkiego naskórka, ale nie w przypadku dwuwymiarowych kultur komórkowych wykorzystywanych w metodzie badawczej krótkiego okresu narażenia.

▼M8

Interpretacja wyników i model prognozowania

26. Wartości gęstości optycznej (OD) otrzymane dla każdej badanej substancji chemicznej są następnie wykorzystywane do obliczenia żywotności komórek w stosunku do kontroli z rozpuszczalnikiem, dla której przyjmuje się 100 %. Względną żywotność komórek wyraża się jako odsetek stanowiący iloraz wartości OD badanej substancji chemicznej i wartości OD kontroli z rozpuszczalnikiem po odjęciu wartości OD próby ślepej od obydwu tych wartości.

$$\dot{Z}ywotność\ kom\acute{o}rek(\%) = \frac{(OD_{570}\ badanej\ substancji\ chemicznej) - (OD_{570}\ próby\ ślepej)}{(OD_{570}\ kontroli\ zrozpuszczalnikiem) - (OD_{570}\ próby\ ślepej)} \times 100$$

Podobnie względną żywotność komórek każdej kontroli z rozpuszczalnikiem wyraża się jako odsetek stanowiący iloraz wartości OD każdej kontroli z rozpuszczalnikiem i wartości OD kontroli podłoża po odjęciu wartości OD próby ślepej od obydwu tych wartości.

27. Należy przeprowadzić trzy niezależne powtórzenia, każde na trzech dołkach stanowiących kontrpróbę (tj. n = 9). Średnią arytmetyczną obliczoną dla trzech dołków w ramach każdego niezależnego powtórzenia dla każdej badanej substancji chemicznej i kontroli z rozpuszczalnikiem wykorzystuje się do obliczenia średniej arytmetycznej względnej żywotności komórek. Ostateczną średnią arytmetyczną żywotności komórek oblicza się na podstawie wyników trzech niezależnych powtórzeń.

28. Wartości graniczne żywotności komórek służące do identyfikowania badanych substancji chemicznych jako powodujące poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) oraz badanych substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP), podano poniżej.

Tabela 2

Model prognozowania dla metody badawczej krótkiego okresu narażenia

Żywotność komórek		Klasyfikacja GHS ONZ / rozporządzenie CLP	Możliwość zastosowania
Przy 5 %	Przy 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Brak kategorii	Substancje i mieszaniny, z wyjątkiem: (i) wysoce lotnych substancji charakteryzujących się prężnością par powyżej 6 kPa ([1]); oraz (ii) stałych chemikaliów (substancji i mieszanin) innych niż środki powierzchniowo czynne i mieszaniny składające się wyłącznie ze środków powierzchniowo czynnych
≤ 70 %	> 70 %	Nie można przewidzieć	Brak możliwości zastosowania
≤ 70 %	≤ 70 %	Kategoria 1	Substancje i mieszaniny ([2])

([1]) Mieszaniny, w których skład wchodzą substancje o prężności par przekraczającej 6 kPa, powinny być ocenianie w taki sposób, aby zagwarantować uniknięcie potencjalnych przypadków zaniżenia prognoz, przy czym w takiej sytuacji odpowiednie uzasadnienie należy sporządzać stosownie do specyfiki danego przypadku.

([2]) W oparciu o wyniki uzyskane głównie dla substancji jednoskładnikowych, chociaż istnieje również ograniczona ilość danych dotyczących badania mieszanin. Niniejsza metoda badawcza ma jednak zastosowanie techniczne w odniesieniu do badania zarówno substancji wieloskładnikowych, jak i mieszanin. Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

▼M8

Kryteria dopuszczalności

29. Wyniki badania uznaje się za dopuszczalne w przypadku spełnienia wszystkich poniższych kryteriów:

a) gęstość optyczna kontroli podłoża (narażonej na oddziaływanie podłoża) powinna wynosić 0,3 lub być wyższa po odjęciu gęstości optycznej próby ślepej;

b) żywotność kontroli z rozpuszczalnikiem powinna odpowiadać 80 % żywotności kontroli podłoża lub być wyższa. Jeżeli w ramach każdego powtórzenia wykorzystuje się szereg kontroli z rozpuszczalnikiem, aby daną badaną substancję chemiczną poddaną badaniu z wykorzystaniem tych rozpuszczalników można było uznać za kwalifikującą się, każda z tych kontroli powinna charakteryzować się żywotnością komórek wyższą niż 80 %;

c) żywotność komórek uzyskana w kontroli dodatniej (0,01 % SDS) powinna mieścić się w przedziale dwóch odchyleń standardowych średniej historycznej. Górne i dolne limity dopuszczalności kontroli dodatniej powinny być często aktualizowane, tj. co najmniej co trzy miesiące lub za każdym razem, gdy dopuszczalne badanie przeprowadza się w laboratoriach, w których rzadko przeprowadza się badania (tj. rzadziej niż raz na miesiąc). Jeżeli laboratorium nie przeprowadziło dostatecznie dużej liczby doświadczeń, aby ustalić istotny statystycznie rozkład danych z kontroli dodatniej, dopuszcza się możliwość zastosowania górnych i dolnych limitów dopuszczalności ustanowionych przez podmiot, który opracował daną metodę badawczą, tj. od 21,1 % do 62,3 % zgodnie z historycznymi danymi laboratoryjnymi znajdującymi się w posiadaniu tego podmiotu, natomiast rozkład wewnętrzny można określić w trakcie pierwszych rutynowych badań.

d) Odchylenie standardowe ostatecznej żywotności komórek wyprowadzone z trzech niezależnych powtórzeń powinno być niższe niż 15 % zarówno w przypadku 5 % stężenia badanej substancji chemicznej, jak i w przypadku 0,05 % stężenia tej substancji.

Jeżeli przynajmniej jedno z powyższych kryteriów nie zostało spełnione, wyniki należy odrzucić, po czym należy przeprowadzić kolejne trzy niezależne powtórzenia.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

30. Należy przedstawić dane dotyczące poszczególnych dołków (np. wartości żywotności komórek) dla każdego powtórzenia, jak również średnią wszystkich wyników, wartość SD oraz informacje na temat klasyfikacji.

Sprawozdanie z badania

31. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna oraz substancje kontrolne:

— Substancja jednoskładnikowa: dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(y) w rejestrze CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

— substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina: opisana w miarę możliwości np. za pomocą nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, występowania ilościowego oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej), w zakresie, w jakim są dostępne;

— stan skupienia, lotność, pH, LogP, masa cząsteczkowa, klasa chemiczna oraz dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne mające znaczenie dla przebiegu badania w zakresie, w jakim są dostępne;

▼**M8**

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— dane na temat warunków przechowywania i stabilności w zakresie, w jakim są dostępne;

Warunki i procedury metody badawczej

— nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań;

— opis zastosowanej metody badawczej;

— informacje na temat zastosowanej linii komórkowej, jej źródła, liczby pasaży oraz konfluencji komórek wykorzystanych w badaniu;

— szczegółowe dane na temat zastosowanej procedury badawczej;

— liczba zastosowanych powtórzeń i użytych kontrprób;

— zastosowane stężenia badanej substancji chemicznej (jeżeli różnią się od zalecanych);

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej;

— czas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej (jeżeli różni się od zalecanego);

— opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej;

— opis zastosowanych kryteriów oceny i podejmowania decyzji;

— odniesienie do historycznych średnich wyników kontroli dodatniej i odchylenia standardowego (SD):

— wykazanie biegłości laboratorium w zakresie stosowania metody badawczej (np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości) lub wykazanie odtwarzalnego przeprowadzenia metody badawczej w miarę upływu czasu.

Wyniki

— dla każdej badanej substancji chemicznej i dla każdej substancji kontrolnej, a także dla każdego badanego stężenia, należy przedstawić tabelę zawierającą indywidualne wartości OD dla każdego dołka stanowiącego kontrpróbę, średnią arytmetyczną wartości OD dla każdego niezależnego powtórzenia, procentową wartość żywotności komórek dla każdego niezależnego powtórzenia oraz ostateczną średnią arytmetyczną procentowej żywotności komórek i SD dla trzech powtórzeń;

— wyniki kontroli podłoża, rozpuszczalnika i kontroli dodatniej potwierdzające spełnienie odpowiednich kryteriów dopuszczalności badania;

— opis innych zaobserwowanych skutków;

— ustalona na tej podstawie ogólna klasyfikacja odnosząca się do zastosowanego modelu prognozowania / zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji.

▼**M8**

Omówienie wyników

Wnioski

BIBLIOGRAFIA

(1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2013), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie piąte zmienione; Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostępne na stronie internetowej: 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" nr 24, s. 1–9.

(3) Mosmann T. (1983). *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays*. „*J. Immunol. Methods*" nr 65, s. 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" nr 22, s. 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" nr 25, s. 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" nr 27, s. 1855–1869.

(7) ICCVAM (2013). *Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document*, NIH. Dostępne na stronie internetowej: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Rozdział B.5 niniejszego załącznika, Działanie żrące/silnie drażniące na oczy.

(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 i Robinson JR. (1973). *Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction*. „J. Pharm. Sci" s. 1648–1653.

(11) ECETOC (1998). *Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank*. Sprawozdanie techniczne (nr 48 (2)), Bruksela, Belgia.

(12) Gautheron P, *et al*. (1992). *Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an* In Vitro *Assay of Ocular Irritancy*. „Fundam. Appl. Toxicol." nr 18, s. 442–449.

(13) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.* Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 34. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(14) OECD (2017). *Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation*. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 263. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

▼**M8**

Dodatek

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności wyników zastosowanej metody badawczej z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (13).

Substancja wzorcowa: substancja używana jako wzorzec do porównań z badaną substancją chemiczną. Substancja wzorcowa powinna cechować się następującymi właściwościami: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji; (iii) znane właściwości fizyczne i chemiczne; (iv) dane potwierdzające występowanie znanych skutków oraz (v) znany potencjał w zakresie pożądanych reakcji.

Podejście oddolne: stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do badanej substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że nie wymaga zaklasyfikowania jako substancja powodująca podrażnienie lub poważne uszkodzenie oka; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych niewymagających zaklasyfikowania (wynik ujemny) od pozostałych substancji chemicznych (wynik dodatni).

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Podrażnienie oka: zmiany w oku spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na wierzchnią warstwę oka, które są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „odwracalne skutki działania na oczy" oraz ze sformułowaniem „kategoria 2 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP".

Odsetek wyników fałszywie ujemnych: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik ujemny. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

Odsetek wyników fałszywie dodatnich: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik dodatni. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub) populacji na taki czynnik.

Kontrola podłoża: kontrpróba niepoddana działaniu badanej substancji chemicznej zawierająca wszystkie składniki układu badawczego. Próbka ta jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji chemicznej oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia, czy rozpuszczalnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji.

Substancja jednoskładnikowa: substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

MTT: bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy MTT.

Substancja wieloskładnikowa: substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu ≥ 10 % (w/w) i < 80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się w wyniku zmieszania co najmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

▼M8

OD: gęstość optyczna.

Kontrola dodatnia: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badawczej (10).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności międzylaboratoryjnej i wewnątrzlaboratoryjnej (13).

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (10).

Poważne uszkodzenie oczu: uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie jest w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „nieodwracalne skutki działania na oczy” oraz ze sformułowaniem „kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP”.

Grupa kontrolna z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, w tym rozpuszczalnik lub nośnik, która jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku lub nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą podłoża próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik lub nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (13).

Substancja: pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

Środek powierzchniowo czynny: zwany także surfaktantem, jest to substancja chemiczna, np. detergent, która może zmniejszać napięcie powierzchniowe cieczy, umożliwiając tym samym jej pienienie lub przenikanie w ciała stałe; substancja ta jest także zwana środkiem zwilżającym.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M8

Wielopoziomowa strategia badań: strategia badań sekwencyjnych, w ramach której wszystkie istniejące informacje na temat badanej substancji chemicznej są analizowane na każdym poziomie w określonym porządku z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia, przed przejściem do następnego poziomu. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji chemicznej potencjał w zakresie wywołania podrażnienia, dodatkowe badania nie są wymagane. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji nie można przypisać badanej substancji chemicznej potencjału w zakresie wywołania podrażnień, przeprowadza się procedurę badań sekwencyjnych na zwierzętach do momentu, w którym będzie można dokonać jednoznacznej klasyfikacji.

Podejście odgórne: stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do badanej substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że powoduje poważne uszkodzenie oczu; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (wynik dodatni) od pozostałych substancji chemicznych (wynik ujemny).

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (1).

Kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP: zob. „Poważne uszkodzenie oczu”.

Kategoria 2 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP: zob. „Działanie drażniące na oczy”.

Brak kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP: Substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane jako należące do kategorii 1 ani 2 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP (lub do kategorii 2A ani 2B wg GHS ONZ).

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

▼M8

B.69 **METODA BADAWCZA WYKORZYSTYWANA W RAMACH BADANIA NA MODELU ZREKONSTRUOWANEGO LUDZKIEGO NABŁONKA PRZYPOMINAJĄCEGO ROGÓWKĘ (RhCE) STOSOWANA DO IDENTYFIKACJI SUBSTANCJI CHEMICZNYCH NIEWYMAGAJĄCYCH KLASYFIKACJI I OZNAKOWANIA POD WZGLĘDEM DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO NA OCZY LUB POWAŻNYCH USZKODZEŃ OCZU**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w wytycznej OECD dotyczącej badań (TG) nr 492 (2017). *Poważne uszkodzenie oczu* oznacza uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie jest w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu, zgodnie z definicją zawartą w Globalnie Zharmonizowanym Systemie Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ) (1) oraz w rozporządzeniu Unii Europejskiej (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (rozporządzenie CLP) ([1]). Ponadto zgodnie z GHS ONZ i rozporządzeniem CLP *podrażnienie oka* oznacza zmiany w oku spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na wierzchnią warstwę oka, które są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Badane substancje chemiczne powodujące poważne uszkodzenie oczu klasyfikuje się jako substancje należące do kategorii 1 wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP, natomiast substancje chemiczne powodujące podrażnienie oczu klasyfikuje się jako substancje należące do kategorii 2 wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP. Badane substancje chemiczne niesklasyfikowane jako powodujące podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu, definiuje się jako te substancje, które nie spełniają wymogów zaklasyfikowania jako należące do kategorii 1 lub 2 (2A lub 2B) wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP, tj. określa się je jako nienależące do żadnej kategorii – brak kategorii wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP.

2. Ocenę służącą ustaleniu, czy doszło do poważnego uszkodzenia oczu / podrażnienia oczu, przeprowadza się zazwyczaj na zwierzętach laboratoryjnych (metoda badawcza B.5 (2)). Na wybór najbardziej odpowiedniej metody badawczej i zastosowanie niniejszej metody badawczej należy patrzeć w kontekście wytycznych OECD w sprawie zintegrowanych podejść do badań i oceny dotyczących poważnych uszkodzeń i podrażnień oczu (39).

3. Niniejsza metoda badawcza opisuje procedurę badania *in vitro* zapewniającą możliwość zidentyfikowania chemikaliów (substancji i mieszanin) niewymagających sklasyfikowania i oznakowania jako chemikalia powodujące podrażnienie oczu lub poważne uszkodzenie oczu zgodnie z GHS ONZ i rozporządzeniem CLP. Wykorzystuje się w niej zrekonstruowany ludzki nabłonek przypominający rogówkę (RhCE), który wiernie imituje właściwości histologiczne, morfologiczne, biochemiczne i fizjologiczne właściwości nabłonka rogówki ludzkiej. Zweryfikowano również cztery inne metody badawcze *in vitro* uznawane za potwierdzone naukowo, przyjmując je jako metody badawcze B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) i B.68 (6) odnoszące się do punktu końcowego polegającego na poważnym uszkodzeniu oczu / podrażnieniu oczu człowieka.

4. W niniejszej metodzie badawczej uwzględniono dwa zweryfikowane badania przeprowadzone przy wykorzystaniu dostępnych na rynku modeli RhCE. Przeprowadzono badania walidacyjne służące do ocenienia stopnia podrażnienia oczu / poważnego uszkodzenia oczu przy wykorzystaniu badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ oraz badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13). W ramach każdego z tych badań w charakterze układu badawczego wykorzystywano dostępne na rynku wytwory tkankowe RhCE, które określa się poniżej jako zwalidowane metody referencyjne – odpowiednio VRM

([1]) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

▼M8

1 i VRM 2. Na podstawie wyników wspomnianych badań walidacyjnych oraz ich niezależnej wzajemnej oceny (9)(12) stwierdzono, że badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ i badanie działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ umożliwiają prawidłowe zidentyfikowanie chemikaliów (substancji i mieszanin) niewymagających klasyfikacji i oznakowania pod względem działania drażniącego na oczy lub poważnego uszkodzenia oczu zgodnie z GHS ONZ, oraz zarekomendowano uznanie tych badań za potwierdzone naukowo w tym celu (13).

5. Obecnie powszechnie uznaje się, że w dającej się przewidzieć przyszłości żadna pojedyncza metoda badawcza *in vitro* nie będzie w stanie w pełni zastąpić testu działania drażniącego na oko *in vivo* wg Draize'a (2)(14) na potrzeby prognozowania pełnego zakresu działania drażniącego różnych klas chemicznych. Strategiczne połączenia szeregu alternatywnych metod badawczy w ramach (wielopoziomowych) strategii badań takich jak podejście oddolne/odgórne mogą jednak być w stanie w pełni zastąpić test działania drażniącego na oko wg Draize'a (15). Podejście oddolne (15) ma w założeniu być stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna nie będzie wywoływała podrażnienia oczu w stopniu wymagających jej sklasyfikowania, podczas gdy podejście odgórne (15) ma być stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna doprowadzi do poważnego uszkodzenia oczu. W celu zidentyfikowania substancji chemicznych niewymagających sklasyfikowania jako substancje wywołujące podrażnienie oczu lub poważne uszkodzenie oczu wg klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP (brak kategorii) bez konieczności przeprowadzenia dalszych badań zaleca się stosowanie badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ i badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ w ramach strategii badania zakładającej stosowanie podejścia oddolnego/odgórnego zaproponowanej przez Scotta *et al.*, np. strategii, w której podejście oddolne stanowi pierwszy etap, lub strategii, w której podejście odgórne stanowi jeden z ostatnich etapów (15). Badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ oraz badanie działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki nie zapewniają jednak możliwości rozróżnienia między kategorią 1 wg GHS ONZ / rozporządzeniem CLP (poważne uszkodzenie oczu) a kategorią 2 wg GHS ONZ / rozporządzeniem CLP (działanie drażniące na oczy). Takie rozróżnienie będzie musiało zostać dokonane na innym poziomie strategii badania (15). Badana substancja chemiczna uznana za wymagającą sklasyfikowania jako powodująca podrażnienie oczu / poważne uszkodzenie oczu w ramach badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ lub w ramach badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ będzie zatem musiała zostać poddana dodatkowym badaniom (*in vitro* lub *in vivo*), aby można było sformułować ostateczny wniosek (brak kategorii, kategoria 2 lub kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP), na przykład przy wykorzystaniu metody badawczej B.47, B.48, B.61 lub B.68.

6. Niniejsza metoda badawcza ma na celu opisanie procedur stosowanych do oceny potencjalnego działania szkodliwego dla oczu badanej substancji chemicznej na podstawie jej potencjału wywoływania cytotoksyczności w wytworze tkankowym RhCE zgodnie z pomiarem w ramach testu MTT (16) (zob. pkt 21). Żywotność wytworu tkankowego RhCE po narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej ustala się w porównaniu z tkankami poddanymi działaniu substancji wykorzystywanej w ramach kontroli ujemnej (procentowa wartość żywotności), po czym wartość tą stosuje się przy przewidywaniu potencjalnego działania szkodliwego dla oczu badanej substancji chemicznej.

7. Aby usprawnić proces walidacji nowych lub zmienionych metod przeprowadzania badań *in vitro* bazujących na RHCE podobnych do badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ i badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ i aby umożliwić terminowe modyfikowanie wytycznych OECD dotyczących badań nr 492 w celu uwzględnienia tych metod badawczych, można skorzystać z dostępnych standardów wykonywania badań (17) opracowanych zgodnie z zasadami ustanowionymi w wytycznych OECD nr 34 (18). Wzajemne uznawanie danych (MAD) zgodnie z porozumieniem OECD będzie możliwe wyłącznie w przypadku badań zweryfikowanych zgodnie ze standardami wykonywania badań, jeżeli te badania zostały poddane przeglądowi i włączone do odpowiednich wytycznych OECD dotyczących badań.

DEFINICJE

8. Definicje znajdują się w dodatku 1.

▼M8

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

9. Niniejszą metodę badawczą przeprowadza się na dostępnych na rynku trójwymiarowych wytworach tkankowych RhCE wytwarzanych przy wykorzystaniu pierwotnych keratynocytów naskórka ludzkiego (tj. EpiOcular™ OCL-200) albo unieśmiertelnionych komórek nabłonkowych ludzkiej rogówki (tj. SkinEthic™ HCE/s). Struktura wytworów tkankowych RhCE EpiOcular™ OCL-200 i SkinEthic™ HCE/S jest podobna do trójwymiarowej struktury komórek nabłonkowych rogówki *in vivo*, a wytwory te wytwarza się przy wykorzystaniu komórek gatunków będących przedmiotem zainteresowania (19)(20). Badania zapewniają ponadto możliwość bezpośredniego pomiaru poziomu cytotoksyczności wywołanej przeniknięciem substancji chemicznej przez rogówkę, co skutkuje uszkodzeniem komórek i tkanek; ogólny wynik badania *in vivo* przejawiający się poważnym uszkodzeniem oczu / podrażnieniem oczu zależy od efektu cytotoksycznego, do którego dochodzi w następstwie przeniknięcia substancji chemicznej przez rogówkę. Choć do uszkodzenia komórek może dojść w następstwie szeregu działań (zob. pkt 20), cytotoksyczność odgrywa istotną – o ile nie najistotniejszą – mechanistyczną rolę w procesie ustalania, czy działanie substancji chemicznej wywołuje ogólną reakcję w postaci poważnego uszkodzenia oczu / podrażnienia oczu, która w badaniu *in vivo* przejawia się głównie zmętnieniem rogówki, zapaleniem tęczówki, zaczerwienieniem błony spojówkowej lub obrzękiem spojówki, niezależnie od procesów fizykochemicznych leżących u podstaw uszkodzenia tkanek.

10. W ramach badania walidacyjnego leżącego u podstaw niniejszej metody badawczej zbadano szerokie spektrum substancji chemicznych obejmujące wiele różnych rodzajów chemikaliów, klas chemicznych, mas cząsteczkowych, LogP, struktur chemicznych itp. Baza danych służących do walidacji badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ zawierała łącznie 113 substancji chemicznych i obejmowała 95 różnych organicznych grup funkcyjnych zgodnie z wynikami analizy zestawu narzędzi OECD QSAR (8). Choć substancje jednoskładnikowe stanowiły większość tych substancji chemicznych, w badaniu uwzględniono również szereg substancji wieloskładnikowych (w tym 3 homopolimery, 5 kopolimerów i 10 quasi-polimerów). Jeżeli chodzi o stan skupienia i kategorie wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP, 113 zbadanych substancji chemicznych sklasyfikowano w następujący sposób: 13 substancji jako ciecze należące do kategorii 1, 15 substancji jako substancje stałe należące do kategorii 1, 6 substancji jako ciecze należące do kategorii 2A, 10 substancji jako substancje stałe należące do kategorii 2A, 7 substancji jako ciecze należące do kategorii 2B, 7 substancji jako ciała stałe należące do kategorii 2B, 27 substancji jako ciecze nieprzypisane do żadnej kategorii i 28 substancji jako ciała stałe nienależące do żadnej kategorii (8). Baza danych służących do walidacji badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ zawierała łącznie 200 substancji chemicznych i obejmowała 165 różnych organicznych grup funkcyjnych (8)(10)(11). Choć substancje jednoskładnikowe stanowiły większość tych substancji chemicznych, w badaniu uwzględniono również szereg substancji wieloskładnikowych (w tym 10 polimerów). Jeżeli chodzi o stan skupienia i kategorie wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP, 200 zbadanych substancji chemicznych sklasyfikowano w następujący sposób: 27 substancji jako ciecze należące do kategorii 1, 24 substancji jako substancje stałe należące do kategorii 1, 19 substancji jako ciecze należące do kategorii 2A, 10 substancji jako substancje stałe należące do kategorii 2A, 9 substancji jako ciecze należące do kategorii 2B, 8 substancji jako ciała stałe należące do kategorii 2B, 50 substancji jako ciecze nieprzypisane do żadnej kategorii i 53 substancje jako ciała stałe nienależące do żadnej kategorii (10)(11).

11. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do substancji i mieszanin, a także do ciał stałych, cieczy, ciał półstałych i wosków. Ciecze mogą być wodne lub niewodne; substancje stałe mogą być rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie. W miarę możliwości substancje stałe należy przed zastosowaniem zmielić na drobnoziarnisty proszek; żadna inna wstępna obróbka próbki nie jest wymagana. W ramach badania walidacyjnego nie oceniano gazów ani aerozoli. Chociaż nie można wykluczyć, że da się je badać z wykorzystaniem technologii RhCE, niniejsza metoda badawcza nie pozwala na badanie gazów i aerozoli.

12. Badane substancje chemiczne pochłaniające światło w takim samym spektrum co formazan MTT (w warunkach naturalnych lub po poddaniu działaniu substancji) oraz badane substancje chemiczne zdolne do bezpośredniego obniżenia zawartości barwnika przyżyciowego MTT (do formazanu MTT) mogą zakłócać pomiary żywotności tkanek, co może wiązać się z koniecznością zastosowania przystosowanych kontroli w celu dokonania korekty. Rodzaj przystosowanych kontroli, których przeprowadzenie może okazać się konieczne, będzie różnił się w zależności od rodzaju zakłócenia wywoływanego przez badaną substancję chemiczną i od rodzaju procedury zastosowanej w celu określenia ilości formazanu MTT (zob. pkt 36–42).

▼**M8**

13. Wyniki badań przedwalidacyjnych (21)(22) i pełnych badań walidacyjnych (8)(10)(11) potwierdziły, że zarówno badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™, jak i badanie działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ mogą być przeprowadzane również w laboratoriach uznawanych za niedoświadczone w dziedzinie przeprowadzania tego rodzaju testów, a ich wyniki mogą zostać odtworzone w laboratoriach i między laboratoriami. Na podstawie wyników tych badań, poziom odtwarzalności zgodności prognoz, którego można oczekiwać w przypadku badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ w oparciu o dane dotyczące 113 substancji chemicznych mieści się w granicach 95 % wewnątrz laboratoriów i 93 % pomiędzy laboratoriami. Poziom odtwarzalności zgodności prognoz, którego można oczekiwać w przypadku badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ w oparciu o dane dotyczące 120 substancji chemicznych mieści się w granicach 92 % wewnątrz laboratoriów i 95 % pomiędzy laboratoriami.

14. Badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ można przeprowadzać w celu zidentyfikowania substancji chemicznych niewymagających sklasyfikowania jako wywołujące podrażnienie oczu lub poważne uszkodzenie oczu zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ / systemem klasyfikacji ustanowionym w rozporządzeniu CLP. Biorąc pod uwagę dane pozyskane w ramach badania walidacyjnego (8), badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ charakteryzowało się ogólną dokładnością na poziomie 80 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 112 substancjach chemicznych), czułością na poziomie 96 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 57 substancjach chemicznych), odsetkiem wyników fałszywie ujemnych na poziomie 4 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 57 substancjach chemicznych), swoistością na poziomie 63 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 55 substancjach chemicznych) oraz odsetkiem wyników fałszywie dodatnich na poziomie 37 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 55 substancjach chemicznych) w zestawieniu z danymi z referencyjnego badania *in vivo* na oku królika (metoda badawcza B.5) (2)(14) sklasyfikowanego zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ / systemem klasyfikacji ustanowionym w rozporządzeniu CLP. W badaniu, w ramach którego zbadano 97 ciekłych preparatów agrochemicznych w formie użytkowej za pomocą badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™, wyniki zastosowania tej metody badawczej w odniesieniu do tego rodzaju mieszanin były zbliżone do wyników badania walidacyjnego (23). 97 postaci użytkowych sklasyfikowano w następujący sposób: 21 postaci użytkowych do kategorii 1, 19 postaci użytkowych do kategorii 2A i 14 postaci użytkowych do kategorii 2B, przy czym 43 postacie użytkowe nie zostały sklasyfikowane do żadnej kategorii zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ w zestawieniu z danymi z badania *in vivo* na oku królika (metoda badawcza B.5) (2)(14). Badanie charakteryzowało się ogólną dokładnością na poziomie 82 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 97 postaciach użytkowych), czułością na poziomie 91 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 54 postaciach użytkowych), odsetkiem wyników fałszywie ujemnych na poziomie 9 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 54 postaciach użytkowych), swoistością na poziomie 72 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 43 postaciach użytkowych) oraz odsetkiem wyników fałszywie dodatnich na poziomie 28 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 43 postaciach użytkowych) (23).

15. Badanie działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ można przeprowadzać w celu zidentyfikowania substancji chemicznych niewymagających sklasyfikowania jako wywołujące podrażnienie oczu lub poważne uszkodzenie oczu zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ / systemem klasyfikacji ustanowionym w rozporządzeniu CLP. Biorąc pod uwagę dane pozyskane w ramach badania walidacyjnego (10)(11), badanie działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ charakteryzowało się ogólną dokładnością na poziomie 84 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 200 substancjach chemicznych), czułością na poziomie 95 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 97 substancjach chemicznych), odsetkiem wyników fałszywie ujemnych na poziomie 5 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 97 substancjach chemicznych), swoistością na poziomie 72 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 103 substancjach chemicznych) oraz odsetkiem wyników fałszywie dodatnich na poziomie 28 % (na podstawie wyników badania przeprowadzonego na 103 substancjach chemicznych) w zestawieniu z danymi z referencyjnego badania *in vivo* na oku królika (metoda badawcza B.5) (2)(14) sklasyfikowanego zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ / systemem klasyfikacji ustanowionym w rozporządzeniu CLP.

16. Odsetki wyników fałszywie ujemnych uzyskane w obydwu badaniach RhCE przeprowadzonych na substancjach albo mieszaninach mieszczą się w wynoszącym 12 % przedziale prawdopodobieństwa, że substancje

▼M8

chemiczne zostaną zidentyfikowane jako należące do kategorii 2 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP albo jako nienależące do żadnej kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP w przypadku przeprowadzenia testu Draize'a na oku *in vivo* w ramach powtórzonych badań; jest to spowodowane zmiennością wewnętrzną badania nieodłącznie związaną ze stosowaniem tej metody (24). Odsetek wyników fałszywie dodatnich uzyskanych po zastosowaniu obydwu metod badawczych RhCE w odniesieniu do substancji albo mieszanin nie ma decydującego znaczenia w przypadku niniejszej metody badawczej, ponieważ wszystkie badane substancje chemiczne, których oddziaływanie prowadzi do osiągnięcia żywotności tkanek równej ustanowionym wartościom progowym lub niższej od tych wartości (zob. pkt 44), będą wymagały zastosowania dodatkowych metod badawczych *in vitro* lub – w ostateczności w przypadku królików, w zależności od obowiązujących wymogów regulacyjnych – zastosowania strategii badań sekwencyjnych w ramach podejścia bazującego na wadze dowodów. Wspomniane metody badawcze można zastosować w odniesieniu do wszystkich rodzajów substancji chemicznych, w przypadku których wynik ujemny powinien zostać uznany za niedający podstaw do sklasyfikowania substancji chemicznej za powodującą podrażnienie i poważne uszkodzenie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP). Przed przeprowadzeniem badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ i badania działania drażniącego na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™ zgodnie z systemami klasyfikacji innymi niż GHS ONZ / system klasyfikacji ustanowiony w rozporządzeniu CLP należy skonsultować się z odpowiednimi organami regulacyjnymi.

17. Ograniczenie niniejszej metody badawczej jest związane z faktem, że nie zapewnia ona możliwości dokonania rozróżnienia między podrażnieniem oczu / wywarciem odwracalnego wpływu na oczy (kategoria 2) a poważnym uszkodzeniem oczu / wywarciem nieodwracalnego wpływu na oczy (kategoria 1) wg klasyfikacji GHS ONZ / klasyfikacji ustanowionej w rozporządzeniu CLP ani między substancjami wywołującymi podrażnienie oczu (fakultatywna kategoria 2A) a substancjami wywołującymi lekkie podrażnienie oczu (fakultatywna kategoria 2B) zgodnie z klasyfikacją GHS ONZ (1). Aby dokonać takiego rozróżnienia, konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań przy wykorzystaniu innych metod badawczych *in vitro*.

18. Termin „badana substancja chemiczna" jest używany w niniejszej metodzie badawczej w odniesieniu do tego, co jest przedmiotem badania ([1]), i nie jest powiązany z zastosowaniem metody badawczej RhCE do badania substancji lub mieszanin.

ZASADA BADANIA

19. Badaną substancję chemiczną nanosi się miejscowo na co najmniej dwa trójwymiarowe wytwory tkankowe RhCE, po czym dokonuje się pomiaru żywotności tkanek po okresie narażenia i okresie inkubacji tkanek przemytych. Tkanki RhCE rekonstruuje się przy wykorzystaniu pierwotnych keratynocytów naskórka ludzkiego lub unieśmiertelnionych komórek nabłonkowych ludzkiej rogówki, które były hodowane przez kilka dni w celu wytworzenia warstwowego, wysoce zróżnicowanego nabłonka płaskiego podobnego do nabłonka występującego w ludzkiej rogówce pod względem morfologicznym. Wytwór tkankowy RhCE EpiOcular™ składa się z co najmniej 3 warstw zdolnych do życia komórek oraz niezrogowaciałej powierzchni o strukturze zbliżonej do struktury rogówki, na której przeprowadza się badanie *in vivo*. Wytwór tkankowy RhCE imitujący ludzki nabłonek rogówki SkinEthic™ składa się z co najmniej 4 warstw zdolnych do życia komórek, uwzględniając kolumnowe komórki bazowe, przejściowe komórki boczne i sztuczne komórki płaskie zbliżone do komórek występujących w prawdziwym nabłonku rogówki (20)(26).

20. Poważne uszkodzenie oczu / podrażnienie oczu wywołane oddziaływaniem substancji chemicznych, które przejawia się *in vivo* głównie zmętnieniem rogówki, zapaleniem tęczówki, zaczerwienieniem błony spojówkowej lub obrzękiem spojówki, stanowi rezultat szeregu zdarzeń, począwszy od przeniknięcia substancji chemicznej przez rogówkę lub błonę spojówkową, a skończywszy na uszkodzeniu komórek. Do uszkodzenia komórek może dość w wyniku szeregu działań, m.in.: lizy błony komórkowej (np. wskutek oddziaływania środków powierzchniowo czynnych, rozpuszczalników organicznych); koagulacji makrocząsteczek (głównie białek) (np. wskutek oddziaływania środków powierzchniowo czynnych, rozpuszczalników

([1]) W czerwcu 2013 r. na posiedzeniu wspólnym OECD uzgodniono, że – w przypadkach, w których będzie to możliwe – w nowych, zaktualizowanych wytycznych dotyczących badań należy obecnie bardziej konsekwentnie stosować termin „badana substancja chemiczna" w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania.

▼M8

organicznych, zasad i kwasów); zmydlania lipidów (np. wskutek oddziaływania zasad); alkilowania makrocząsteczek lub innych interakcji kowalencyjnych z makrocząsteczkami (np. wskutek oddziaływania wybielaczy, nadtlenków i alkilatorów) (15)(27)(28). Wykazano jednak, że cytotoksyczność odgrywa istotną – o ile nie najistotniejszą – mechanistyczną rolę w procesie ustalania, czy działanie substancji chemicznej wywołuje ogólną reakcję w postaci poważnego uszkodzenia oczu / podrażnienia oczu niezależnie od procesów fizykochemicznych leżących u podstaw uszkodzenia tkanek (29)(30). Ponadto potencjał wywołania poważnego uszkodzenia oczu / podrażnienia oczu przez daną substancję chemiczną ustala się przede wszystkim na podstawie skali początkowych obrażeń (31), która odpowiada skali uśmiercenia komórek (29) oraz skali późniejszych reakcji i ewentualnych rezultatów (32). Dlatego też substancje wywołujące lekkie podrażnienie zasadniczo wpływają wyłącznie na nabłonek rogówki, substancje wywołujące łagodne i umiarkowane podrażnienie wpływają głównie na nabłonek i sztuczną tkankę podskórną, natomiast substancje silnie drażniące uszkadzają nabłonek, głęboko położoną tkankę podskórną i niekiedy śródbłonek rogówki (30)(33). Pomiar żywotności wytworu tkankowego RhCE po miejscowym narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej przeprowadzany w celu zidentyfikowania substancji chemicznych niewymagających sklasyfikowania jako wywołujące poważne uszkodzenie oczu / podrażnienie oczu (brak kategorii wg klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP) opiera się na założeniu, że wszystkie substancje chemiczne wywołujące poważne uszkodzenie oczu lub podrażnienie oczu będą wywierały cytotoksyczny wpływ na nabłonek lub błonę spojówkową.

21. Żywotność tkanek RhCE klasycznie mierzy się metodą enzymatycznej konwersji barwnika przyżyciowego MTT [bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy; MTT; numer CAS 298-93-1] przez komórki żywotne tkanki w niebieską sól formazanu MTT, którą oznacza się ilościowo po ekstrakcji z tkanek (16). Substancje chemiczne, które zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP nie wymagają sklasyfikowania i oznakowania (brak kategorii), identyfikuje się jako substancje nieobniżające żywotności tkanek poniżej ustalonego progu (tj. żywotność tkanek > 60 % w przypadku badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ i badania działania drażniącego na oczy EITL SkinEthic™ ([1]) lub > 50 % w przypadku badania działania drażniącego na oczy EITS SkinEthic™ ([2])) (zob. pkt 44).

WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

22. Przed przystąpieniem do rutynowego przeprowadzania badań RhCE do celów regulacyjnych laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo przewidując działanie piętnastu substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości wymienionych w tabeli 1. Wspomniane substancje chemiczne zostały wybrane spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w badaniach walidacyjnych dotyczących VRM (8)(10)(11). Wybrane substancje chemiczne obejmują – w zakresie, w jakim jest to możliwe – substancje, które: (i) występują w różnych stanach skupienia; (ii) obejmują pełne spektrum reakcji *in vivo* w postaci poważnego uszkodzenia oczu / podrażnienia oczu stwierdzonych w oparciu o wysokiej jakości wyniki uzyskane po przeprowadzeniu porównania z wynikami badania na oku królika *in vivo* (metoda badawcza B.5) (2)(14) oraz poprzez odniesienie do systemu klasyfikacji GHS ONZ (tj. kategorie 1, 2A, 2B lub brak kategorii) (1) i systemem klasyfikacji ustanowionym w rozporządzeniu CLP (tj. kategorie 1, 2 lub brak kategorii); (iii) obejmują różne kryteria klasyfikacji *in vivo* (24)(25); (iv) są reprezentatywne dla klas chemicznych wykorzystywanych w badaniu walidacyjnym (8)(10)(11); (v) reprezentują odpowiednią i szeroką grupę organicznych grup funkcyjnych (8)(10)(11); (vi) mają dobrze określone struktury chemiczne (8)(10)(11); (vii) są zabarwione lub stanowią bezpośrednie reduktory MTT; (viii) doprowadziły do uzyskania odtwarzalnych wyników w ramach metod badawczych RhCE podczas ich walidacji; (ix) zostały prawidłowo zidentyfikowane w ramach metod badawczych RhCE w trakcie poświęconych im badań walidacyjnych; (x) obejmują pełne spektrum reakcji *in vitro* w oparciu o wysokiej jakości dane uzyskane w ramach metod badawczych RhCE (0–100 % żywotności); (xi) są dostępne na rynku; oraz (xii) ich pozyskiwanie lub utylizacja nie wiąże się z koniecznością ponoszenia nadmiernie wysokich kosztów. W sytuacjach, w których substancja chemiczna figurująca w wykazie jest niedostępna lub nie może zostać wykorzystana z innych uzasadnionych względów, dopuszcza się możliwość zastosowania innej substancji chemicznej spełniającej opisane powyżej kryteria, np. substancji wybranej spośród substancji chemicznych wykorzystywanych do walidacji VRM. Takie odstępstwa powinny jednak być uzasadnione.

([1]) EITL: badanie działania drażniącego cieczy na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™

([2]) EITS: badanie działania drażniącego substancji stałych na oczy na ludzkim nabłonku rogówki SkinEthic™

▼M8

Tabela 1

Wykaz substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości

Nazwa systematyczna	Numer CAS	Organiczna grupa funkcyjna ([1])	Stan skupienia	Żywotność VRM1 (%) ([2])	Żywotność VRM2 (%) ([3])	Prognoza dotycząca VRM	Reduktor MTT	Zakłócenie barwy
Kategoria 1 *in vivo* ([4])								
Tioglikolan metylu	2365-48-2	Ester kwasu karboksylowego; tioalkohol	C	10,9±6,4	5,5±7,4	Nie można przewidzieć	T (silny)	N
Akrylan hydroksyetylu	818-61-1	Akrylan; alkohol	C	7,5±4,7 ([5])	1,6±1,0	Nie można przewidzieć	N	N
2,5-dimetylo-2,5-heksanodiol	110-03-2	alkohol	S	2,3±0,2	0,2±0,1	Nie można przewidzieć	N	N
Szczawian sodu	62-76-0	Kwas oksokarboksylowy	S	29,0±1,2	5,3±4,1	Nie można przewidzieć	N	N
Kategoria 2A in vivo ([4])								
N,N″-bis (4-chlorofenylo)-3,12-diimino-di-D-glukonian diimidu amidowego 2,4,11,13-tetraazatetradekanu (20 %, roztwór wodny) ([6])	18472-51-0	Heterocykliczny halogenek aromatyczny; halogenek arylu; grupa dihydroksylowa; guanidyna	C	4,0±1,1	1,3±0,6	Nie można przewidzieć	N	T (słaba)
Benzoesan sodu	532-32-1	Aryl; Kwas karboksylowy	S	3,5±2,6	0,6±0,1	Nie można przewidzieć	N	N
Kategoria 2B *in vivo* ([4])								
N,N-dietylo-*m*-toluamid	134-62-3	Benzamid	C	15,6±6,3	2,8±0,9	Nie można przewidzieć	N	N
2,2-dmetylo-3-metylenobicyclo[2.2.1]heptan	79-92-5	Alkan rozgałęziony o trzeciorzędowy węgiel; Alken; Bicykloheptan; Związki karbocykliczne z pierścieniem połączonym mostkiem; Cykloalkan	S	4,7±1,5	15,8±1,1	Nie można przewidzieć	N	N
Substancje chemiczne określane mianem „brak kategorii” wykorzystywane do badań *in vivo* ([4])								
1-etylo-3-metyloimidazoliowy siarczan etylu	342573-75-5	Alkoksy; Sól amonowa; Aryl; Imidazol; Siarczan	C	79,9±6,4	79,4±6,2	Brak kategorii	N	N

▼M8

Nazwa systematyczna	Numer CAS	Organiczna grupa funkcyjna (1)	Stan skupienia	Żywotność VRM1 (%) (2)	Żywotność VRM2 (%) (3)	Prognoza dotycząca VRM	Reduktor MTT	Zakłócenie barwy
Eter (di)oktylu	629-82-3	Alkoksy; eter	C	97,8±4,3	95,2±3,0	Brak kategorii	N	N
Butotlenek piperonylu	51-03-6	Alkoksy; Benzodioksol; Benzyl; eter	C	104,2±4,2	96,5±3,5	Brak kategorii	N	N
Olej rycynowy uwodorniony glikolem polietylenowym (PEG-40)	61788-85-0	Acylal; Alkohol; Allil; eter	Lepka konsystencja	77,6±5,4	89,1±2,9	Brak kategorii	N	N
1-(4-chlorofenylo)-3-(3,4-dichlorofenylo)mocznik	101-20-2	Heterocykliczny halogenek aromatyczny; Halogenek arylu; Pochodne mocznika	S	106,7±5,3	101,9±6,6	Brak kategorii	N	N
2,2′-metyleno-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetrametylobutyl)-fenol)	103597-45-1	Alkan rozgałęziony o czwartorzędowy węgiel; Skondensowany karbocykliczny związek aromatyczny; Skondensowane nasycone związki heterocykliczne; Związki będące prekursorami chinonowymi; związki tert-butylowe	S	102,7±13,4	97,7±5,6	Brak kategorii	N	N
Tetrofluoroboran potasu	14075-53-7	Sól nieorganiczna	S	88,6±3,3	92,9±5,1	Brak kategorii	N	N

Skróty:

Numer CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service; GHS ONZ = Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (1); VRM1 = zwalidowana metoda referencyjna, badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™; VRM2 = zwalidowana metoda referencyjna, badanie działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™; Zakłócenie barwy = pomiar zakłócenia barwy za pomocą absorbancji wzorca (gęstość optyczna (OD)) formazanu MTT.

(1) Organiczna grupa funkcyjna przydzielona zgodnie z zagnieżdżoną analizą w ramach OECD Toolbox 3.1 (8).

(2) Na podstawie wyników badania działania drażniącego na oczy EpiOcular™ w laboratorium referencyjnym Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach / w ramach badania walidacyjnego drażniącego działania na oczy Cosmetics Europe (EIVS) (8).

(3) Na podstawie wyników uzyskanych za pomocą badania działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ w badaniu walidacyjnym (10)(11).

(4) Na podstawie wyników badania na oku królika *in vivo* (metoda badawcza B.5 / wytyczna OECD TG 405) (2)(14) i z zastosowaniem GHS ONZ.

(5) Na podstawie wyników badania CEFIC „CONsortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI)".

(6) Zaklasyfikowanie do kategorii 2A lub 2B zależy od interpretacji kryterium GHS ONZ dotyczącego rozróżnienia tych dwóch kategorii, tj. 1 spośród 3 zwierząt lub 2 spośród 3 zwierząt, u których w dniu 7. odnotowano skutki niezbędne do zakwalifikowania substancji chemicznej do kategorii 2A. W badaniu *in vivo* brały udział 3 zwierzęta. Wszystkie punkty końcowe poza zmętnieniem rogówki u jednego zwierzęcia zupełnie ustały do dnia 7. lub wcześniej. Jedno ze zwierząt, u którego skutki działania substancji nie ustały do 7. dnia, miało zmętnienie rogówki na poziomie 1 (w 7. dniu), które ustało w pełni w 9. dniu.

23. W ramach wykazywania efektywności zaleca się, aby użytkownicy sprawdzili właściwości bariery cechujące tkanki po ich otrzymaniu, zgodnie ze wskazaniami producenta wytworu tkankowego RhCE (zob. pkt 25, 27 i 30). Jest to szczególnie istotne, jeżeli tkanki są wysłane na duże odległości lub w długich okresach czasu. Gdy badanie zostało z powodzeniem wprowadzone oraz nabyto biegłość w jego przeprowadzaniu i zostało to wykazane, weryfikacja taka nie będzie konieczna w ramach rutynowej procedury. W przypadku rutynowego zastosowania badania zaleca się jednak, aby w dalszym ciągu oceniać właściwości bariery w regularnych odstępach czasu.

▼M8

PROCEDURA

24. Niniejsza metoda badawcza obejmuje obecnie potwierdzone naukowo badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ oraz badanie działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (odpowiednio VRM1 i VRM2). Standardowe procedury operacyjne dotyczące metod badawczych RhCE są dostępne i należy z nich korzystać przy wdrażaniu i stosowaniu metod badawczych w warunkach laboratoryjnych (34)(35). W poniższych punktach oraz w dodatku 2 opisano najistotniejsze elementy i procedury badań RhCE.

SKŁADOWE METODY BADANIA RHCE

Warunki ogólne

25. W celu odtworzenia trójwymiarowej tkanki nabłonka przypominającej rogówkę, która powinna się składać ze stopniowo nawarstwionych ale nie zrogowaciałych komórek, należy użyć odpowiednich komórek pochodzących od człowieka. Wytwór tkankowy RhCE przygotowuje się w insertach z porowatą membraną syntetyczną, przez którą składniki odżywcze mogą się przedostać do komórek. W zrekonstruowanym nabłonku przypominającym rogówkę powinno się znajdować wiele warstw żywotnych, niezrogowaciałych komórek nabłonka. Powierzchnia nabłonkowa wytworu tkankowego RhCE powinna mieć bezpośredni kontakt z powietrzem w celu umożliwienia bezpośredniego miejscowego narażenia na działanie badanej substancji w podobny sposób, jak w przypadku narażenia nabłonka rogówki w badaniu *in vivo*. Wytwór tkankowy RhCE powinien uformować funkcjonalną barierę, która jest na tyle wytrzymała, aby uniemożliwiała szybkie przenikanie cytotoksycznych wzorcowych substancji, np. Triton X-100 lub soli sodowej siarczanu dodecylu (SDS). Funkcję bariery należy wykazać i można ocenić poprzez ustalenie czasu narażenia na działanie potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % (ET_{50}) po zastosowaniu substancji wzorcowej w określonym, stałym stężeniu (np., 100 µl 0,3 % (obj./obj.) Triton X-100) lub stężenia, w którym substancja wzorcowa zmniejsza żywotność tkanek o 50 % (IC_{50}) po ustalonym czasie narażenia na działanie (np. 30-minutowym poddaniu działaniu substancji z wykorzystaniem 50 µl SDS) (zob. pkt 30). Właściwości izolacyjne wytworu tkankowego RhCE powinny zapobiegać przedostawaniu się badanej substancji chemicznej przez krawędź żywej tkanki, gdyż w innym razie modelowanie narażenia rogówki mogłoby być niewłaściwe. Pochodzące od człowieka komórki, które wykorzystuje się do stworzenia wytworu tkankowego RhCE, nie powinny być skażone bakteriami, wirusami, mykoplazmą ani grzybami. Dostawca powinien sprawdzić sterylność wytworu tkankowego pod kątem braku skażenia grzybami i bakteriami.

Warunki funkcjonalne

Żywotność

26. Testem stosowanym do określenia ilościowego żywotności tkanki jest test MTT (16). Komórki żywotne wytworu tkankowego RhCE redukują barwnik przyżyciowy MTT do wytrąconego niebieskiego formazanu MTT, który jest później ekstrahowany z komórki przy użyciu izopropanolu (lub podobnego rozpuszczalnika). Ekstrahowany formazan MTT można określić ilościowo, stosując pomiar absorbancji wzorca (gęstość optyczna – OD) lub procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC (36). OD samego rozpuszczalnika do ekstrakcji powinna być wystarczająco niska, tj. OD < 0,1. Użytkownicy wytworu tkankowego RhCE powinni zapewnić zgodność każdej partii zastosowanego wytworu tkankowego RhCE z określonymi kryteriami kontroli ujemnej. Zakresy dopuszczalności kontroli ujemnej wartości OD dotyczące VRM przedstawiono w tabeli 2. Użytkownik spektrofotometrii HPLC/UPLC powinien stosować kontrolę ujemną zakresów OD określonych w tabeli 2 jako warunku dopuszczenia kontroli ujemnej. W sprawozdaniu z badania należy udokumentować stabilność w hodowli (uzyskiwanie podobnych wyników pomiarów żywotności tkanki) tkanki poddanej działaniu substancji kontroli ujemnej w badanym okresie narażenia. Podobną procedurę powinien stosować producent tkanek w ramach zwolnienia serii na podstawie kontroli

▼M8

jakości, ale w tym przypadku mogą mieć zastosowanie inne kryteria dopuszczalności niż kryteria określone w tabeli 2. Zakres dopuszczalności (górna i dolna granica) kontroli ujemnej wartości OD (w warunkach metody badania kontroli jakości) powinni określić producenci/dostawcy wytworu tkankowego RhCE.

Tabela 2

Zakresy dopuszczalności dla kontroli ujemnej wartości OD (dla użytkowników badania)

Badanie	Dolna granica dopuszczalności	Górna granica dopuszczalności
Badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (zarówno w przypadku protokołów dotyczących cieczy, jak i substancji stałych)	> 0,8 ([1])	< 2,5
badanie działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (HCE/S) – VRM2 (zarówno w przypadku protokołów dotyczących cieczy, jak i substancji stałych)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Ta granica dopuszczalności uwzględnia ewentualne wydłużenie czasu transportu/przechowywania (np. > 4 dni), co do którego wykazano, że nie ma wpływu na przeprowadzenie metody badawczej (37).

Funkcja bariery

27. Wytwór tkankowy RhCE powinien być na tyle gruby i szczelny, aby powstrzymać szybkie przenikanie cytotoksycznych substancji wzorcowych, zgodnie z oszacowaniem np. za pomocą ET_{50} (Triton X-100) lub IC_{50} (SDS) (tabela 3). Producent/dostawca wytworu tkankowego RhCE powinien w momencie dostarczenia tkanek użytkownikowi końcowemu wykazać funkcję bariery każdej partii zastosowanego wytworu tkankowego RhCE (zob. pkt 30).

Morfologia

28. Badanie histologiczne wytworu tkankowego RhCE powinno wykazać istnienie struktury nabłonka przypominającego rogówkę (w tym co najmniej trzech warstw żywotnych komórek nabłonkowych i niezrogowaciałej powierzchni). W przypadku VRM odpowiednią morfologię ustala producent/dostawca, a więc użytkownik metody badawczej nie musi jej ponownie wykazywać dla każdej partii tkanek.

Odtwarzalność

29. Wyniki dodatniej kontroli oraz ujemnych w ramach metody badawczej powinny wykazywać odtwarzalność w czasie.

Kontrola jakości (QC)

30. Wytwór tkankowy RhCE należy stosować jedynie w przypadku, gdy producent lub dostawca wykaże, że każda partia wykorzystywanego wytworu tkankowego RhCE spełnia określone kryteria zwolnienia do produkcji, spośród których najbardziej istotne są te dotyczące żywotności (pkt 26)i funkcji bariery (pkt 27). Zakres dopuszczalności (górna i dolna granica) dotyczący funkcji bariery zmierzonej za pomocą ET_{50} lub IC_{50} (zob. pkt 25 i 26) powinien określić producent/dostawca wytworu tkankowego RhCE. Zakres dopuszczalności ET_{50} and IC_{50} zastosowany przez producenta/dostawcę wytworów tkankowych RhCE (wykorzystywanych w VRM) jako kryterium zwolnienia serii na podstawie kontroli jakości przedstawiono w tabeli 3. Producent/dostawca wytworu tkankowego RhCE powinien dostarczyć dane potwierdzające zgodność ze wszystkimi kryteriami zwolnienia do produkcji użytkownikom metody badawczej, tak aby mogli oni uwzględnić te informacje w sprawozdaniu z badania. Do wiarygodnego przewidzenia, że dane substancje chemiczne nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje drażniące oczy lub powodujące poważne uszkodzenie oczu zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP, można przyjąć wyłącznie wyniki uzyskane z użyciem tkanek spełniających wszystkie kryteria zwolnienia do produkcji.

▼M8

Tabela 3

Kryterium zwolnienia serii na podstawie kontroli jakości

Badanie	Dolna granica dopuszczalności	Górna granica dopuszczalności
Badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3 % (obj./obj.) Triton X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
badanie działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (HCE/S) – VRM2 (30-minutowe poddanie działaniu substancji z wykorzystaniem 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej

31. W każdej serii badawczej należy użyć co najmniej dwóch kontrprób tkanek w przypadku każdej badanej i kontrolnej substancji chemicznej. Stosuje się dwa różne protokoły poddawania działaniu substancji – jeden dla badanych substancji chemicznych w stanie ciekłym, a drugi dla badanych substancji chemicznych w stanie stałym (34)(35). W przypadku obu metod i protokołów powierzchnię wytworu tkankowego należy przed podaniem badanych substancji chemicznych zwilżyć roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami Dulbecco wolnym od wapnia i magnezu (DPBS wolny od Ca^{2+}/Mg^{2+}), aby odwzorować mokre warunki w ludzkim oku. Poddawanie tkanek działaniu substancji rozpoczyna się od narażenia ich na działanie badanych i kontrolnych substancji chemicznych. W przypadku obu protokołów podawania działaniu substancji w obu VRM należy nałożyć na skórę dostateczną ilość badanej lub kontrolnej substancji chemicznej, tak aby równomiernie pokrywała powierzchnię nabłonka, unikając jednak nakładania dawki nieskończonej (zob. pkt 32 i 33) (dodatek 2).

32. Badane substancje chemiczne, które można podawać pipetą w temperaturach na poziomie 37 °C lub niższych (w stosownych przypadkach wykorzystując pipetę typu D), traktuje się w VRM jako ciecze, a w innym przypadku należy je traktować jako substancje stałe (zob. pkt 33). W VRM badaną substancję chemiczną równomiernie rozprowadza się na powierzchni tkanki (tj. stosuje się co najmniej 60 µl/cm^2) (zob. dodatek 2, (33)(34)). Aby zagwarantować właściwe dawkowane tkanek, należy w jak największym stopniu uniknąć wystąpienia efektów kapilarnych (efektów napięcia powierzchniowego), które mogą wyniknąć z nałożenia na insert (na powierzchnię tkanki) niewielkiej ilości substancji. Tkanki podawane działaniu badanych substancji chemicznych w stanie ciekłym inkubuje się przez 30 minut w normalnych warunkach hodowli kultur (37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH). Pod koniec okresu narażenia badaną należy ostrożnie usunąć substancję chemiczną w stanie ciekłym i substancje kontrolne z powierzchni tkanki stosując intensywne płukanie za pomocą DPBS wolnego od Ca^{2+}/Mg^{2+} w temperaturze pokojowej. Po etapie płukania następuje zanurzenie po zakończeniu narażenia w świeżym podłożu w temperaturze pokojowej (w celu usunięcia badanej substancji chemicznej wchłoniętej przez tkankę) na wcześniej określony czas, zależny od zastosowanej VRM. Jedynie w przypadku VRM1 przed przeprowadzeniem testu MTT należy zastosować inkubację po zakończeniu narażenia w świeżym podłożu w normalnych warunkach hodowli kultur (zob. dodatek 2, (34) (35)).

33. Badane substancje chemiczne, których nie można podawać pipetą w temperaturach na poziomie 37 °C lub niższych traktuje się w VRM jako substancje stałe. Ilość podawanej badanej substancji chemicznej powinna być wystarczająca do pokrycia całej powierzchni tkanki, tj. należy nałożyć co najmniej 60 mg/cm^2 (dodatek 2). W miarę możliwości substancje stałe powinny być badane w postaci drobnoziarnistego proszku. Tkanki poddane działaniu badanych substancji chemicznych w stanie stałym inkubuje się przez wcześniej określony czas (w zależności od zastosowanej VRM) w normalnych warunkach hodowli kultur (zob. dodatek 2, (34) (35)). Pod koniec okresu narażenia badaną należy ostrożnie usunąć substancję chemiczną w stanie stałym i substancje kontrolne z powierzchni tkanki stosując intensywne płukanie za pomocą DPBS wolnego od Ca^{2+}/Mg^{2+} w temperaturze

▼M8

pokojowej. Po etapie płukania następuje zanurzenie po zakończeniu narażenia w świeżym podłożu w temperaturze pokojowej (w celu usunięcia badanej substancji chemicznej wchłoniętej przez tkankę) na wcześniej określony czas, zależny od zastosowanej VRM, oraz zanurzenie po narażeniu w świeżym podłożu w normalnych warunkach hodowli kultur przed przeprowadzeniem testu MTT (zob. dodatek 2, (34)(35)).

34. W każdej serii badawczej należy uwzględnić równoczesną kontrolę ujemną i kontrolę dodatnią, aby wykazać, że żywotność (określona w kontroli ujemnej) oraz czułość (określona w kontroli dodatniej) tkanek mieszczą się w zakresach dopuszczalności ustalonych na podstawie danych historycznych. Jednoczesna kontrola ujemna dostarcza również wartość bazową (100 % żywotności tkanek) na potrzeby obliczenia względnej procentowej żywotności tkanek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej (%$Viability_{test}$). Substancją służącą do kontroli dodatniej zalecaną do stosowania w VRM jest czysty octan metylu (nr CAS 79-20-9, dostępny na rynku od np. Sigma-Aldrich, nr katalogowy 45997; ciecz). Substancjami służącymi do kontroli ujemnej zalecanymi do stosowania w VRM1 i VRM2 są odpowiednio ultraczyste H_2O oraz DPBS wolny od Ca^{2+}/Mg^{2+}. Były to substancje kontrolne wykorzystane w badaniach walidacyjnych dotyczących VRM i istnieje na ich temat najwięcej danych historycznych. W przypadku zastosowania odpowiednich alternatywnych substancji służących do kontroli ujemnej lub dodatniej należy to odpowiednio naukowo uzasadnić. Kontrole dodatnie i ujemne należy badać za pomocą tych samych protokołów, które wykorzystano do badania substancji chemicznych w danej serii badawczej (tj. cieczy lub substancji stałych). Po takim zastosowaniu należy przeprowadzić, w stosownych przypadkach, poddanie narażeniu na działanie substancji, płukanie, zanurzenie po zakończeniu narażenia oraz inkubację po zakończeniu narażenia, jak opisano w przypadku prób kontrolnych poddawanych badaniu równolegle z badanymi substancjami chemicznych w stanie ciekłym (zob. pkt 32) lub w przypadku kontroli poddawanych badaniu równolegle z badanymi substancjami chemicznych w stanie stałym (zob. pkt 33) przed przeprowadzeniem testu MTT (zob. pkt 35) (34)(35). W przypadku wszystkich badanych substancji chemicznych o tym samym stanie skupienia (ciecze lub substancje stałe), będących częścią jednej serii badawczej, wystarczy jeden zestaw kontroli ujemnych i dodatnich.

Pomiary żywotności tkanek

35. Test MTT stanowi uznaną metodą ilościową (16), którą należy wykorzystywać do pomiarów żywotności tkanek w ramach niniejszej metody badawczej. Można ją stosować do badań z użyciem trójwymiarowego wytworu tkankowego. Test MTT przeprowadza się natychmiast po okresie inkubacji po zakończeniu narażenia. W ramach VRM wytwór tkankowy RhCE umieszcza się w 0,3 ml roztworu MTT przy 1 mg/ml na 180±15 min w normalnych warunkach hodowli kultur. Komórki żywotne wytworu tkankowego RhCE redukują barwnik przyżyciowy MTT do wytrąconego niebieskiego formazanu MTT. Produkt wytrącania niebieskiego formazanu MTT ekstrahuje się następnie z tkanki przy użyciu odpowiedniej ilości izopropanolu (lub podobnego rozpuszczalnika) (34)(35). Tkanki zbadane za pomocą badanych substancji chemicznych w stanie ciekłym należy ekstrahować zarówno z góry, jak i z dołu tkanki, podczas gdy tkanki zbadane za pomocą badanych substancji chemicznych w stanie stałym oraz cieczy zabarwionych należy ekstrahować jedynie z dołu tkanki (w celu zminimalizowania ewentualnego skażenia roztworu ekstrakcyjnego izopropanolu jakąkolwiek badaną substancją chemiczną, która mogła pozostać na tkance). Tkanki zbadane za pomocą badanych substancji chemicznych w stanie ciekłym, które nie są łatwe do zmycia, również można ekstrahować jedynie z dołu tkanki. Badane równolegle substancje służące do kontroli ujemnej i dodatniej należy potraktować podobnie do badanej substancji chemicznej. Ekstrahowany formazan MTT można określić ilościowo albo przy pomocy pomiaru absorbancji wzorca (OD) przy 570 nm, wykorzystując filtr w paśmie maksimum ±30 nm, albo przy pomocy procedury spektrofotometrii HPLC/UPLC (zob. pkt 42) (11)(36).

▼M8

36. Właściwości optyczne badanej substancji chemicznej lub jej oddziaływanie chemiczne na MTT mogą zakłócać pomiar formazanu MTT, prowadząc do błędnego oszacowania żywotności tkanki. Badane substancje chemiczne mogą zakłócać pomiar formazanu MTT poprzez bezpośrednią redukcję MTT do niebieskiego formazanu MTT lub na skutek zakłócenia barwy, jeżeli badana substancja chemiczna jest chłonna, w sposób naturalny lub w wyniku procedur poddania działaniu badanej substancji w tym samym zakresie gęstości optycznej co formazan MTT (tj. ok 570 nm). Przed badaniem należy wykonać wstępne kontrole, aby umożliwić identyfikację potencjalnych bezpośrednich reduktorów MTT lub substancji chemicznych zakłócających barwę oraz należy wykorzystać dodatkowe próby kontrolne do wykrycia i skorygowania potencjalnej interferencji takich badanych substancji chemicznych (zob. pkt 37–41). Jest to istotne zwłaszcza w przypadku niepełnego usunięcia określonej substancji badanej z wytworu tkankowego RhCE za pomocą płukania lub gdy substancja ta przeniknie przez nabłonek przypominający rogówkę, przez co pozostaje obecna w wytworach tkankowych RhCE podczas przeprowadzania testu MTT. W przypadku badanych substancji chemicznych pochłaniających światło w takim samym zakresie, jak formazan MTT (naturalnie lub po poddaniu działaniu substancji), które nie są zgodne z pomiarem absorbancji wzorca (OD) formazanu MTT ze względu na zbyt silną interferencję, tj. silną absorbcję przy 570±30 nm, można zastosować procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT (zob. pkt 41 i 42) (11)(36). Szczegółowy opis sposobu wykrywania i skorygowania redukcji MTT i zakłóceń przez barwniki jest dostępny w standardowych procedurach operacyjnych dotyczących VRM (34)(35). Przykładowe schematy zawierające wytyczne dotyczące sposobu identyfikacji i obchodzenia się z bezpośrednimi reduktorami MTT lub substancjami chemicznymi zakłócającymi barwę w VRM1 i VRM2 przedstawiono również odpowiednio w dodatkach III i IV.

37. W celu identyfikacji potencjalnej interferencji wynikającej z tego, że badane substancje chemiczne pochłaniają światło w tym samym zakresie co formazan MTT (naturalnie lub po poddaniu działaniu substancji), i podjęcia decyzji o konieczności zastosowania dodatkowych kontroli badaną substancję chemiczną dodaje się do wody lub izopropanolu i inkubuje się odpowiednio długo w temperaturze pokojowej (zob. dodatek 2, (34)(35)). Jeżeli w wodzie lub izopropanolu badana substancja chemiczna pochłania wystarczającą ilość światła w zakresie 570 ± 20 nm, w przypadku VRM1 (zob. dodatek 3), lub jeżeli w wyniku zmieszania badanej substancji chemicznej z wodą uzyskuje się barwiony roztwór, w przypadku VRM2 (zob. dodatek 4), zakłada się, że badana substancja chemiczna zakłóca pomiar absorbancji wzorca (OD) formazanu MTT i należy przeprowadzić kolejne pogłębione kontrole z barwnikiem lub, alternatywnie, należy zastosować procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC i wtedy te kontrole nie są konieczne (zob. pkt 41 i 42 oraz dodatki III i IV)(34)(35). Podczas dokonywania pomiaru absorbancji wzorca (OD) należy nałożyć każdą zakłócającą badaną substancję chemiczną na co najmniej dwie kontrpróby żywych tkanek, które w celu uzyskania barwy nieswoistej w kontroli żywych tkanek (NSC_{living}) podlegają pełnej procedurze badawczej, ale podczas etapu inkubacji z MTT są inkubowane z pożywką zamiast z roztworem MTT (34)(35). Kontrolę NSC_{living} należy przeprowadzać równolegle z badaniem barwionej substancji chemicznej, a w przypadku wielokrotnego badania, niezależną kontrolę NSC_{living} należy przeprowadzić podczas każdego wykonanego badania (w każdej serii badawczej) z powodu naturalnej różnorodności biologicznej żywych tkanek. Rzeczywistą żywotność tkanek oblicza się jako: odsetek żywotności tkanek uzyskanej w wyniku narażenia żywych tkanek na zakłócanie badaną substancją chemiczną i inkubowanych w roztworze MTT ($\%Viability_{test}$), pomniejszony o odsetek tkanek o barwie nieswoistej uzyskany w wyniku narażenia żywych tkanek na zakłócenie badaną substancją chemiczną i inkubowanych na podłożu bez MTT, w badaniu przeprowadzonym jednocześnie z korygowanym badaniem ($\%NSC_{living}$), tj. rzeczywista żywotność tkanek = [$\%Viability_{test}$] - [$\%NSC_{living}$].

38. W celu identyfikacji bezpośrednich reduktorów MTT, każdą badaną substancję chemiczną należy dodać do świeżo przygotowanego roztworu MTT. Do roztworu MTT dodaje się odpowiednią ilość badanej substancji chemicznej i inkubuje się tę mieszaninę przez około 3 godziny w normalnych

▼M8

warunkach hodowli kultur (zob. dodatki III i IV)(34)(35). Jeżeli mieszanina MTT zawierająca badaną substancję chemiczną (lub zawiesina w przypadku nierozpuszczalnej badanej substancji chemicznej) zmieni barwę na niebieską/fioletową, zakłada się, że badana substancja chemiczna bezpośrednio redukuje MTT i należy przeprowadzić pogłębioną kontrolę funkcjonalną nieżywotnych wytworów tkankowych RhCE, stosując niezależnie pomiar absorbancji wzorca (OD) lub procedurę spektrofotometrii HPLC/UPLC. Do tej dodatkowej kontroli funkcjonalnej używa się martwych tkanek, które wykazują jedynie resztkową aktywność metaboliczną, ale wchłaniają i zatrzymują badaną substancję chemiczną w podobny sposób, co tkanki żywotne. Martwe tkanki w VRM1 przygotowuje się, narażając je na działanie niskiej temperatury („uśmiercenie przez zamrożenie"). Martwe tkanki w VRM2 przygotowuje się za pomocą przedłużone inkubacji (np. co najmniej 24±1 h) w wodzie, po czym następuje przechowywanie w niskiej temperaturze („uśmiercenie wodą"). Każda substancja chemiczna redukująca MTT nanoszona jest na co najmniej dwie kontrpróby martwych tkanek, które przechodzą przez pełną procedurę badawczą, by wygenerować kontrolę nieswoistej redukcji MTT (NSMTT) (34)(35). Pojedyncza kontrola NSMTT jest wystarczająca w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, niezależnie od liczby przeprowadzonych niezależnych badań/serii badawczych. Rzeczywistą żywotność tkanek oblicza się jako: odsetek żywotności tkanek uzyskaną przy pomocy żywych tkanek narażonych na działanie reduktora MTT (%$Viability_{test}$) pomniejszony o odsetek nieswoistej redukcji MTT uzyskany w wyniku narażenia martwych tkanek na działanie tego samego reduktora MTT, obliczony relatywnie względem kontroli ujemnej przeprowadzonej jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSMTT), tj. rzeczywista żywotność tkanek = [%$Viability_{test}$] - [%NSMTT].

39. Badane substancje chemiczne, które zidentyfikowano jako powodujące zarówno zakłócenie barwy (zob. pkt 37), jak bezpośrednią redukcję MTT (zob. pkt 38), będą podczas wykonywania pomiaru absorbancji wzorca (OD) wymagały również trzeciego zestawu kontroli, oprócz kontroli NSMTT i NSC_{living} opisanych w poprzednich punktach. Dzieje się tak zazwyczaj w przypadku badanych substancji chemicznych o ciemnym zabarwieniu, które pochłaniają światło w zakresie 570±30 nm (np. niebieska, fioletowa, czarna), ponieważ ich barwa swoista utrudnia ocenę zdolności do bezpośredniej redukcji MTT, jak opisano w pkt 38. Stwarza to konieczność domyślnego stosowania kontroli NSMTT wraz z kontrolami NSC_{living}. Badane substancje chemiczne, w odniesieniu do których przeprowadza się kontrole NSMTT i NSC_{living}, mogą zostać wchłonięte i zatrzymane zarówno przez żywe, jak i martwe tkanki. Zatem w tym przypadku kontrola NSMTT może nie tylko korygować potencjalną bezpośrednią redukcję MTT wywołaną przez badaną substancję chemiczną, ale również zakłócenie barwy wynikającą z wchłaniania i zatrzymywania badanej substancji chemicznej przez martwe tkanki. Mogłoby to doprowadzić do podwójnej korekty zakłócenia barwy, ponieważ kontrola NSC_{living} koryguje już zakłócenie barwy wynikające z wchłaniania i zatrzymywania badanej substancji chemicznej przez żywe tkanki. Aby uniknąć podwójnej korekty możliwej w przypadku zakłócenia barwy, należy przeprowadzić trzecią kontrolę nieswoistego zabarwienia martwych tkanek (NSC_{killed}) (zob. dodatki III i IV)(34)(35). W trakcie tej dodatkowej kontroli badana substancja chemiczna nakładana jest na co najmniej dwie kontrpróby martwych kontrprób tkanek na czas narażenia, które podlegają pełnemu badaniu, ale są inkubowane z pożywką zamiast z roztworem MTT w trakcie etapu inkubacji z MTT. Pojedyncza kontrola NSC_{killed} jest wystarczająca dla każdej badanej substancji chemicznej, niezależnie od liczby przeprowadzonych niezależnych badań/serii badawczych, lecz powinna być przeprowadzana jednocześnie z kontrolą NSMTT z wykorzystaniem tej samej partii tkanki. Rzeczywistą żywotność tkanek oblicza się jako: odsetek żywotności tkanek uzyskanych za pomocą żywych tkanek narażonych na działanie badanej substancji chemicznej (%$Viability_{test}$) pomniejszony o %NSMTT, pomniejszony o%NSC_{living}, zwiększony o odsetek tkanek o nieswoistej barwie uzyskany z martwych tkanek narażonych na zakłócenie badaną substancją chemiczną i inkubowanych na podłożu bez MTT, obliczony w stosunku do kontroli ujemnej przeprowadzonej jednocześnie z korygowanym badaniem (%NSC_{killed}), tj. rzeczywista żywotność tkanek = [%$Viability_{test}$] - [%NSMTT] - [%NSC_{living}] + [%NSC_{killed}].

▼**M8**

40. Należy zauważyć, że nieswoista redukcja MTT i nieswoiste zakłócenia barwy mogą zwiększyć OD (podczas przeprowadzania pomiarów absorbancji wzorca) ekstraktu tkankowego powyżej zakresu liniowości spektrofotometru i że niespecyficzna redukcja MTT może również zwiększyć powierzchnię piku formazanu MTT (podczas przeprowadzania pomiaru spektrofotometrii HPLC/UPLC) ekstraktu tkankowego powyżej zakresu liniowości spektrofotometru. W związku z tym istotne jest, aby każde laboratorium przed rozpoczęciem badania badanych substancji chemicznych do celów regulacyjnych określiło liniowość zakresu OD / powierzchni piku swojego spektrofotometru za pomocą np. formazanu MTT (CAS # 57360-69-7) dostępnego na rynku np. od Sigma-Aldrich (nr katalogowy M2003).

41. Pomiar absorbancji wzorca (OD) z wykorzystaniem spektrofotometru jest odpowiedni do oceny bezpośrednich reduktorów MTT oraz zakłócających barwę badanych substancji chemicznych, gdy odnotowane zakłócenie pomiaru formazanu MTT nie jest zbyt silne (np. gdy OD ekstraktów tkankowych uzyskanych za pomocą badanej substancji chemicznej bez skorygowania bezpośredniej redukcji MTT lub interferencji koloru mieszczą się w liniowym zakresie spektrofotometru). Niemniej jednak wyniki badanych substancji chemicznych wytwarzających %NSMTT lub $\%NSC_{living} \geq 60$ % (VRM1 oraz VRM2 w przypadku protokołu dotyczącego cieczy) lub 50 % (VRM2 w przypadku protokołu dotyczącego substancji stałych) kontroli ujemnej powinny być przyjmowane z ostrożnością, ponieważ stanowi to ustaloną granicę odcięcia stosowaną w VRM do odróżniania substancji chemicznych sklasyfikowanych od niesklasyfikowanych (zob. pkt 44). Nie można jednak przeprowadzić pomiaru absorbancji wzorca (OD) jeżeli zakłócenia pomiaru formazanu MTT są zbyt silne (np. jeżeli prowadzą do sytuacji, w której nieskorygowane wartości OD badanych ekstraktów tkankowych znajdą się poza liniowym zakresem spektrofotometru). Barwne badane substancje chemiczne lub badane substancje chemiczne barwiące się przy kontakcie z wodą lub izopropanolem, które zbyt silnie zakłócają pomiar absorbancji wzorca (OD) formazanu MTT, można wciąż poddać ocenie, wykorzystując spektrofotometrię HPLC/UPLC (zob. dodatki III i IV). Wynika to z tego, że system HPLC/UPLC umożliwia oddzielenie formazanu MTT od badanej substancji chemicznej przed jej oznaczeniem ilościowym (36). Z tego powodu kontrole NSC_{living} lub NSC_{killed} nie są nigdy wymagane, gdy wykorzystuje się spektrofotometrię HPLC/UPLC, niezależnie od badanej substancji chemicznej. Kontrole NSMTT należy jednak stosować, jeżeli istnieje podejrzenie, że badana substancja chemiczna bezpośrednio redukuje MTT (zgodnie z procedurą opisaną w pkt 38). Kontrole NSMTT należy również stosować w przypadku badania substancji chemicznych mających zabarwienie (swoiste lub pojawiające się, kiedy substancja znajduje się w wodzie), który utrudnia ocenę zdolności substancji do bezpośredniej redukcji MTT, jak opisano w pkt 38. W przypadku stosowania spektrofotometrii HPLC/UPLC do pomiaru formazanu MTT procent żywotności tkanek oblicza się jako procent MTT powierzchni piku formazanu uzyskanej z żywych tkanek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej w stosunku do piku formazanu MTT uzyskanego przy równoczesnej kontroli ujemnej. W przypadku badanych substancji chemicznych zdolnych do bezpośredniej redukcji MTT, rzeczywistą żywotność tkanek oblicza się jako: $\%Viability_{test}$ minus %NSMTT, jak opisano w ostatnim zdaniu pkt 38. Na koniec należy zauważyć, że bezpośrednich reduktorów MTT lub bezpośrednich reduktorów MTT powodujących również zakłócenie barwy, które są zatrzymywane w tkankach po poddaniu działaniu substancji i redukują MTT tak bardzo, że prowadzą do sytuacji, w której wartości OD (przy użyciu standardowego pomiaru OD) lub powierzchnie piku (przy użyciu spektrofotometrii UPLC/HPLC) badanych ekstraktów tkankowych wykraczają poza zakres liniowości spektrofotometru – nie można ocenić za pomocą metod badawczych RhCE, chociaż przewiduje się, że wystąpią tylko w bardzo rzadkich sytuacjach.

42. Spektrofotometria HPLC/UPLC może być stosowana ze wszystkimi rodzajami badanych substancji chemicznych (barwnych, bezbarwnych, reduktorów MTT i substancji nieredukujących MTT) do pomiaru formazanu MTT (11)(36). Ponieważ systemy spektrofotometrii HPLC/UPLC są zróżnicowane, ustalanie przez wszystkich użytkowników dokładnie tych samych warunków

▼M8

dotyczących systemu jest niepraktyczne. W związku z tym należy wykazać kwalifikację systemu spektrofotometrii HPLC/UPLC przed jego zastosowaniem, aby określić ilościowo formazan MTT z ekstraktów tkankowych poprzez spełnienie kryteriów dopuszczalności zestawu standardowych parametrów kwalifikacyjnych w oparciu na kryteriach opisanych w wytycznych Agencji Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych dotyczących przemysłu walidacji metodą bioanalityczną (36)(38). Te kluczowe parametry i kryteria ich dopuszczalności przedstawiono w dodatku 5. Po spełnieniu kryteriów dopuszczalności określonych w dodatku 5, system spektrofotometrii HPLC/UPLC uznaje się za kwalifikowany i gotowy do pomiaru formazanu MTT w warunkach doświadczalnych opisanych w niniejszej metodzie badawczej.

Kryteria dopuszczalności

43. W przypadku każdej serii badawczej z wykorzystaniem partii tkanek RhCE, które przeszły kontrolę jakości (zob. pkt 30), tkanki poddane działaniu substancji przeznaczonej do celów kontroli ujemnej powinny wykazywać wartość OD odzwierciedlającą jakość tkanek, które przeszły wszystkie etapy wysyłki i odbioru oraz wszystkie procesy protokołu badania, i nie powinny mieścić się poza ustalonymi na podstawie danych historycznych granicami opisanymi w tabeli 2 (zob. pkt 26). Podobnie, tkanki poddane działaniu substancji służącej do kontroli dodatniej, tj. octan metylu, powinny wykazywać średnią żywotność tkanki < 50 % w odniesieniu do kontroli ujemnej w ramach VRM1 przy zastosowaniu albo protokołu dotyczącego cieczy, albo dotyczącego substancji stałych; oraz ≤ 30 % (protokół dotyczący cieczy) lub ≤ 20 % (protokół dotyczący substancji stałych) w odniesieniu do kontroli negatywnej w VRM2, tym samym odzwierciedlając zdolność tkanek do reakcji na drażniącą badaną substancję chemiczną w warunkach danej metody badawczej (34)(35). Zmienność między kontrpróbami tkanek w przypadku badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych powinna mieścić się w dopuszczalnych granicach (tj. różnica w żywotności między dwoma kontrpróbami tkanek powinna wynosić mniej niż 20 % lub odchylenie standardowe między trzema kontrpróbami tkanek nie powinno przekraczać 18 %). Jeżeli uwzględniona w serii badawczej kontrola ujemna lub dodatnia nie mieści się w dopuszczalnych zakresach, seria badawcza zostaje uznana za „niekwalifikującą się" i należy ją powtórzyć. Jeżeli zmienność między kontrpróbami tkanek w przypadku danej badanej substancji chemicznej wykracza poza dopuszczalne zakresy, badanie trzeba uznać za „niekwalifikujące się" i należy ponownie przebadać daną badaną substancję chemiczną.

Interpretacja wyników i model prognozowania

44. Wartości / powierzchnie piku OD uzyskane przy wykorzystaniu kontrprób ekstraktów tkankowych dla każdej badanej substancji chemicznej należy wykorzystać do obliczenia średniej procentowej żywotności tkanek (średniej między kontrpróbami tkanek) znormalizowanej w odniesieniu do kontroli ujemnej, której żywotność ustala się na 100 %. Wartość graniczną procentowej żywotności tkanek służącą do identyfikowania badanych substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP), podano w tabeli 4. Wynik należy zatem interpretować w następujący sposób:

— Badaną substancję chemiczną określa się jako niewymagającą klasyfikacji i oznakowania wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP (brak kategorii), jeżeli średnia procentowa żywotności tkanek po narażeniu i inkubacji po narażeniu jest wyższa (>) niż ustalona wartość graniczna procentowej żywotności tkanek, jak przedstawiono w tabeli 4. W takim przypadku nie ma konieczności przeprowadzenia dalszych badań w ramach innych metod badawczych.

▼M8

— Jeżeli średnia procentowa żywotności tkanek po narażeniu i inkubacji po narażeniu jest niższa lub równa (≤) niż ustalona wartość graniczna procentowej żywotności tkanek, nie można przewidzieć działania, jak przedstawiono w tabeli 4. W takim przypadku niezbędne będzie przeprowadzenie dalszych badań w ramach innych metod badawczych, ponieważ metody badawcze RhCE dają szereg wyników fałszywie dodatnich (zob. pkt 14–15) i nie mogą rozróżnić między kategoriami 1 i 2 wg GHS ONZ i rozporządzenia CLP (zob. pkt 17).

Tabela 4

Modele prognozowania wg klasyfikacji GHS ONZ / rozporządzenia CLP

Kategoria VRM	Brak kategorii	Nie można przewidzieć działania
VRM1 - badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ (w przypadku obu protokołów)	Średnia żywotność tkanek > 60 %	Średnia żywotność tkanek ≤ 60 %
VRM2 – badanie działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (w przypadku protokołu dotyczącego cieczy)	Średnia żywotność tkanek > 60 %	Średnia żywotność tkanek ≤ 60 %
VRM2 – badanie działania drażniącego na oczy z wykorzystaniem ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (w przypadku protokołu dotyczącego substancji stałych)	Średnia żywotność tkanek > 50 %	Średnia żywotność tkanek ≤ 50 %

45. Jeśli wynik jest jednoznaczny, w przypadku badanej substancji chemicznej wystarczy pojedyncze badanie składające się z co najmniej dwóch kontrprób tkanek. W przypadku wyników granicznych, np. niezgodności powtarzalnych pomiarów lub średniej procentowej żywotności tkanek równej 60 ± 5 % (VRM1 i VRM2 w przypadku protokołu dotyczącego cieczy) lub 50 ± 5 % (VRM2 w przypadku protokołu dotyczącego substancji stałych), należy jednak rozważyć przeprowadzenie drugiego badania, jak również trzeciego w przypadku niezgodności między wynikami dwóch pierwszych badań.

46. W stosownych i uzasadnionych przypadkach w odniesieniu do określonych rodzajów mieszanin można rozważyć zastosowanie innych wartości granicznych procentowej żywotności tkanek służących do odróżnienia badanych substancji chemicznych sklasyfikowanych i nieklasyfikowanych, aby zwiększyć ogólną skuteczność metody badawczej dla tych rodzajów mieszanin (zob. pkt 14). Wzorcowe substancje chemiczne mogą się okazać przydatne do oceny potencjału poważnego uszkodzenia oczu/podrażnienia oczu nieznanych badanych substancji chemicznych lub klasy produktowej lub do oceny względnego potencjału toksyczności sklasyfikowanej substancji chemicznej dla oczu w określonym zakresie reakcji dodatnich.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

47. Dane z poszczególnych kontrprób tkanek w serii badawczej (np. dane dotyczące wartości OD / powierzchni piku formazanu MTT i obliczonej procentowej żywotności tkanek dla każdej badanej substancji chemicznej i kontroli, łącznie z końcową prognozą dotyczącą metody badawczej RhCE) należy przedstawić w formie tabelarycznej w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, w stosownych przypadkach uwzględniając dane z powtórzonych badań. Należy również przedstawić średnią procentową żywotność tkanek i różnicę w żywotności między dwoma kontrpróbami tkanek (jeżeli n = 2 kontrpróby tkanek) lub SD (jeżeli n ≥ 3 kontrprób tkanek) w odniesieniu do poszczególnych badanych substancji chemicznych i kontroli. Należy zgłosić, w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, wszelkie odnotowane zakłócenia w pomiarze formazanu MTT wynikające ze spowodowanej przez badaną substancję chemiczną bezpośredniej redukcji MTT lub zakłócenia barwy.

Sprawozdanie z badania

48. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

▼**M8**

Badana substancja chemiczna

Substancja jednoskładnikowa

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(y) w rejestrze CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

— stan skupienia, lotność, pH, LogP, masa cząsteczkowa, klasa chemiczna oraz dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne mające znaczenie dla przebiegu badania w zakresie, w jakim są dostępne;

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— dane na temat warunków przechowywania i stabilności w zakresie, w jakim są dostępne;

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina

— maksymalnie szczegółowa charakterystyka wykonana np. za pomocą nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, występowania ilościowego oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej), w zakresie, w jakim są dostępne;

— stan skupienia oraz dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne mające znaczenie dla przebiegu badania w zakresie, w jakim są dostępne;

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— dane na temat warunków przechowywania i stabilności w zakresie, w jakim są dostępne;

Substancje służące do kontroli dodatniej i ujemnej

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(y) w rejestrze CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

— stan skupienia, lotność, masa cząsteczkowa, klasa chemiczna oraz dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne mające znaczenie dla przebiegu badania w zakresie, w jakim są dostępne;

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie;

— uzasadnienie zastosowania innej kontroli ujemnej niż ultraczysta H2O lub DPBS wolne od Ca2+/Mg2+, w stosownych przypadkach;

— uzasadnienie zastosowania innej kontroli dodatniej niż czysty octan metylu, w stosownych przypadkach;

— odniesienie do wyników historycznych kontroli dodatnich i ujemnych, w których zastosowano odpowiednie kryteria dopuszczalności serii badawczej.

Informacje dotyczące sponsora i placówki przeprowadzającej badanie

— nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań.

— *Zastosowany wytwór tkankowy RhCE i protokół (oraz uzasadnienie wyboru w stosownych przypadkach)*

▼**M8**

Warunki metody badawczej

— zastosowany wytwór tkankowy RhCE, w tym numer partii;

— długość fali i filtr środkowoprzepustowy (w stosownych przypadkach) stosowany do określenia ilościowego formazanu MTT oraz zakres liniowości urządzenia pomiarowego (np. spektrofotometru);

— opis metody wykorzystanej do oceny ilościowej formazanu MTT;

— opis stosowanego systemu spektrofotometrycznego HPLC/UPLC, w stosownych przypadkach;

— pełne informacje podstawowe na temat stosowanego wytworu tkankowego RhCE, z uwzględnieniem jego efektywności. Powinno to między innymi obejmować:

i) kontrolę jakości dotyczącą żywotności (dostawca);

ii) żywotność w warunkach metody badawczej (użytkownik);

iii) kontrolę jakości dotyczącą funkcji bariery;

iv) morfologię, jeżeli jest dostępna;

v) odtwarzalność i zdolność predykcyjną;

vi) inne kontrole jakości (QC) dotyczące wytworu tkankowego RhCE, jeżeli są dostępne;

— odwołanie do danych historycznych wytworu tkankowego RhCE. Powinno to między innymi obejmować: dopuszczalność danych QC z odwołaniem do danych dotyczących serii historycznych;

— oświadczenie, że placówka badawcza wykazała się biegłością w stosowaniu metody badawczej przed przystąpieniem do jej rutynowego stosowania za pomocą badania substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości;

Kryteria dopuszczalności badania i serii badawczej

— średnie wartości oraz zakresy dopuszczalności dodatniej i ujemnej kontroli na podstawie danych historycznych;

— dopuszczalna zmienność wśród kontrprób tkanek w przypadku dodatniej i ujemnej kontroli;

— dopuszczalna zmienność między kontrpróbami tkanek w przypadku badanej substancji chemicznej;

Procedura badania

— informacje szczegółowe dotyczące zastosowanej procedury badawczej;

— dawki podawanych badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych;

— czas trwania i temperatura podczas okresów narażenia, zanurzenia po zakończeniu narażenia oraz inkubacji po zakończeniu narażenia (w stosownych przypadkach);

— opis wszelkich modyfikacji w procedurze badawczej;

▼M8

— wskazanie prób kontroli używanych w odniesieniu do bezpośrednich reduktorów MTT lub badanych substancji chemicznych, które w wyniku reakcji przechodzą w barwny produkt, w stosownych przypadkach;

— liczba kontrprób tkanek wykorzystanych na badaną substancję chemiczną i kontrolę (kontrola dodatnia, kontrola ujemna oraz NSMTT, NSC_{living} i NSC_{killed}, w stosownych przypadkach);

Wyniki

— tabelaryczne zestawienie danych uzyskanych w badaniu poszczególnych badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych dla każdej serii badawczej (uwzględniając, w stosownych przypadkach, powtórzone doświadczenia) i każdego pomiaru kontrpróby, w tym wartości OD lub powierzchnia piku formazanu MTT, procentowa żywotność tkanek, średnia procentowa żywotność tkanek, różnica między kontrpróbami lub SD oraz prognoza końcowa;

— w stosownych przypadkach wyniki kontroli używanych w odniesieniu do bezpośrednich reduktorów MTT lub barwnych substancji chemicznych, w tym wartości OD lub powierzchnia piku formazanu MTT, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, różnica pomiędzy kontrpróbami tkanki lub SD, ostateczna prawidłowa procentowa żywotność tkanek oraz prognoza końcowa;

— wyniki uzyskane z zastosowaniem badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych w odniesieniu do określonych kryteriów dopuszczalności serii badawczej i badania;

— opis innych zaobserwowanych skutków, np. zabarwienie tkanek przez barwioną substancja chemiczna;

Omówienie wyników

Wniosek

BIBLIOGRAFIA

(1) ONZ (2015). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), ST/SG/AC.10/30/Rev.6, wydanie szóste zmienione, Nowy Jork i Genewa: Organizacja Narodów Zjednoczonych. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Rozdział B.5 niniejszego załącznika, Działanie żrące/silnie drażniące na oczy.

(3) Rozdział B.47 niniejszego załącznika, *Metoda badania zmętnienia i przepuszczalności rogówki u bydła do celów identyfikacji i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu oraz ii) substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje drażniące oczy lub powodujące poważne uszkodzenie oczu*.

(4) Rozdział B.48 niniejszego załącznika, *Metoda badania na izolowanym oku kurzym do celów identyfikacji i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu oraz ii) substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania*.

(5) Rozdział B.61 niniejszego załącznika, *Metoda badania utraty fluoresceiny do celów identyfikacji substancji żrących i silnie drażniących dla oczu.*

▼**M8**

(6) Rozdział B.68 niniejszego załącznika, *Metoda badawcza in vitro krótkiego okresu narażenia do celów identyfikacji i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu oraz ii) substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje drażniące oczy lub powodujące poważne uszkodzenie oczu.*

(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* nr 27, Specjalne wydanie 2010, s. 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. Dostępne na stronie internetowej: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) Naukowy komitet doradczy EURL ECVAM (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.* Opinia ESAC nr 2014-03 z dnia 17 listopada 2014 r.; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Dostępne na stronie internetowej: 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" nr 31, s. 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" nr 34, s. 55–70.

(12) Naukowy komitet doradczy EURL ECVAM (2016). *ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT).* Opinia ESAC nr 2016-02 z dnia 24 czerwca 2016 r.; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Dostępne na stronie internetowej: 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.* (Tekst w przygotowaniu).

(14) J.H. Draize, G. Woodard i H.O. Calvery (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" nr 82, s. 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" nr 24, s. 1–9.

▼**M8**

(16) Mosmann, T. (1983). *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. „Journal of Immunological Methods"* Methods nr 65, s. 55–63.

(17) OECD (2016). *Seria dotycząca badań i oceny nr 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.* Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(18) OECD (2005). *Seria dotycząca badań i oceny nr 34*: *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.* Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(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."* nr 39, s. 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.* [W:] *Alternative Toxicological Methods*, H. Salemi S.A. Katz (red.), CRC Press, s. 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" nr 27, s. 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" nr 27, s. 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."* nr 43, s. 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.* nr 88, s. 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.* nr 91, s. 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" nr 17, s. 113–126.

▼**M8**

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). *Eye Irritation.* [W:] *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* F.N Marzulli i H.I. Maibach (red.), wydanie czwarte, s. 749–815. Waszyngton, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). *Toxic Responses of the Ocular and Visual System.* [W:] *Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* C.D. Klaassen (red.), wydanie siódme, s. 665–697. Withby, ON, Kanada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). *Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. „Invest. Ophthalmol. Vis. Sci."* nr 39, s. 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."* nr 36, s. 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" nr 15, s. 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."* nr 39, s. 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.* nr 25, s. 41–54.

(34) *EpiOcular™ EIT SOP*, wersja 8 (z dnia 5 marca 2013 r.). *EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals.* Dostępne na stronie internetowej: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) *SkinEthic™ HCE EIT SOP,* wersja 1. (z dnia 20 lipca 2015 r.). *SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals.* Dostępne na stronie internetowej: 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*" nr 29, s. 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." nr 43, s. 101–127.

(38) US FDA (2001). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.* U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, maj 2001. Dostępne na stronie internetowej: 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*. [W:] Seria dotycząca badań i oceny nr 263, publikacje na temat środowiska. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

▼**M8**

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności wyników zastosowanej metody badawczej z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (18).

Wzorcowa substancja chemiczna: substancja chemiczna używana jako wzorzec do porównań z badaną substancją chemiczną. Wzorcowa substancja chemiczna powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a) na potrzeby jej identyfikacji i charakterystyki; (ii) podobieństwo strukturalne, funkcjonalne, chemiczne lub związane z klasą produktową do badanych substancji chemicznych; (iii) znane właściwości fizyczne i chemiczne; (iv) dane potwierdzające znane skutki; oraz (v) znaną siłę działania w zakresie pożądanych reakcji.

Podejście oddolne: stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do badanej substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że nie wymaga zaklasyfikowania i oznakowania jako substancja powodująca podrażnienie lub poważne uszkodzenie oka; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych niewymagających zaklasyfikowania i oznakowania (wynik ujemny) od pozostałych substancji chemicznych (wynik dodatni).

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Zgodność: zob. „dokładność".

Rogówka: przezroczysta warstwa w przedniej części gałki ocznej, która okrywa tęczówkę i źrenicę oraz wpuszcza światło do wnętrza oka.

CV: Współczynnik zmienności.

Dev: odchylenie.

EIT: badanie działania drażniącego na oczy.

EURL ECVAM: laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach.

Podrażnienie oka: zmiany w oku spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na wierzchnią warstwę oka, które są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „odwracalne skutki działania na oczy" oraz ze sformułowaniem „kategoria 2 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP".

ET_{50}: czas narażenia na działanie potrzebny do zmniejszenia żywotności tkanek o 50 % po zastosowaniu wzorcowej substancji chemicznej w określonym, stałym stężeniu.

Odsetek wyników fałszywie ujemnych: odsetek wszystkich substancji dających wynik dodatni fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik ujemny. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

Odsetek wyników fałszywie dodatnich: odsetek wszystkich substancji dających wynik ujemny fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik dodatni. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub) populacji na taki czynnik.

HCE: ludzki nabłonek rogówki SkinEthic™.

▼M8

HPLC: wysokosprawna chromatografia cieczowa.

IC_{50}: stężenie, w którym wzorcowa substancja chemiczna powoduje zmniejszenie żywotności tkanek o 50 % po stałym czasie narażenia na działanie (np. 30-minutowe poddanie działaniu substancji z wykorzystaniem SDS).

Dawka nieskończona: ilość badanej substancji chemicznej nakładana na wytwór tkankowy RhCE przekraczająca ilość konieczną do całkowitego, jednolitego pokrycia powierzchni nabłonka.

Nieodwracalne skutki działania na oczy: zob. „Poważne uszkodzenie oczu".

LLOQ: dolna granica oznaczalności.

LogP: Logarytm współczynnika podziału oktanol-woda

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji.

Substancja jednoskładnikowa: substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

Substancja wieloskładnikowa: substancja zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu ≥ 10 % (w/w) i < 80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się w wyniku zmieszania co najmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

MTT: bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy MTT.

Kontrola ujemna: próbka zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że nie wywołuje reakcji dodatniej w układzie badawczym. Próbkę tę przetwarza się razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji chemicznej i z innymi próbkami kontrolnymi oraz wykorzystuje się ją do określenia 100 % żywotności komórek.

Niesklasyfikowane: substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane jako substancje podrażniające oczy (kategoria 2 wg GHS/CLP ONZ, kategoria 2A lub 2B wg GHS ONZ) ani substancje powodujące poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS/CLP ONZ). Określenie używane zamiennie ze sformułowaniem „brak kategorii wg GHS/CLP ONZ".

NSC_{killed}: barwa nieswoista martwych tkanek.

NSC_{living}: barwa nieswoista żywych tkanek.

NSMTT: nieswoista redukcja MTT.

OD: gęstość optyczna.

Standardy wykonywania badań (PS): standardy oparte na zwalidowanej metodzie badawczej, którą uznano za naukowo uzasadnioną, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badania, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: (i) zasadnicze elementy metody badawczej; (ii) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania dopuszczalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz (iii) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badania, który proponowana metoda badania powinna osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia (18).

▼M8

Kontrola dodatnia: próbka zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią w układzie badawczym. Próbkę tę przetwarza się razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji chemicznej i z innymi próbkami kontrolnymi. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badania (18).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej i międzylaboratoryjnej (18).

Badanie zastępcze: badanie, które ma na celu zastąpienie badania stosowanego rutynowo i zaakceptowanego do identyfikacji zagrożeń lub oceny ryzyka i w odniesieniu do którego ustalono, że w porównaniu do zaakceptowanego badania zapewnia odpowiednio równoważną lub lepszą ochronę zdrowia ludzi lub zwierząt lub środowiska we wszystkich możliwych warunkach badania i w odniesieniu do wszystkich możliwych substancji chemicznych (18).

Odtwarzalność: zgodność wyników uzyskanych w wyniku powtarzanego badania tej samej badanej substancji chemicznej przy użyciu tego samego protokołu badania (zob. „Wiarygodność”) (18).

Odwracalne skutki działania na oczy: zob. „Działanie drażniące na oczy”.

RhCE: zrekonstruowany ludzki nabłonek przypominający rogówkę.

Seria badawcza: Seria badawcza obejmuje przynajmniej jedną badaną substancję chemiczną, badaną równocześnie z kontrolą ujemną i kontrolą dodatnią.

SD: odchylenie standardowe.

Czułość: odsetek wszystkich dodatnich/aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki kategoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (18).

▼M8

Poważne uszkodzenie oczu: uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie jest używane zamiennie z określeniem „nieodwracalne skutki działania na oczy" oraz ze sformułowaniem „kategoria 1 wg GHS i CLP ONZ".

Standardowe procedury operacyjne (SPO): formalne, sporządzone w formie pisemnej procedury szczegółowo opisujące sposób, w jaki należy przeprowadzać właściwe rutynowe operacje laboratoryjne oraz operacje laboratoryjne właściwe dla danego badania. Procedur tych wymaga się w ramach dobrej praktyki laboratoryjnej.

Swoistość: odsetek wszystkich negatywnych/nieczynnych badanych chemikaliów prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki kategoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (18).

Substancja: pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

Badanie: pojedyncza badana substancja chemiczna badana jednocześnie na co najmniej dwóch kontrpróbach tkanek, co określono w odpowiadającej standardowej procedurze operacyjnej.

Żywotność tkanek: parametr określający całkowitą aktywność populacji komórek w zrekonstruowanych tkankach jako ich zdolność do obniżenia zawartości barwnika przyżyciowego MTT, który, w zależności od pomiaru końcowego i zastosowanego schematu badania odpowiada całkowitej liczbie lub żywotności komórek.

Podejście odgórne: stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że powoduje poważne uszkodzenie oczu; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (wynik dodatni) od pozostałych substancji chemicznych (wynik ujemny).

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Wielopoziomowa strategia badań: Strategia badań sekwencyjnych, w ramach której metody badawcze stosuje się w sposób sekwencyjny. Wszystkie istniejące informacje na temat badanej substancji chemicznej są analizowane na każdym poziomie z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia, przed przejściem do następnego poziomu w obrębie strategii. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji chemicznej potencjał / siłę działania w zakresie zagrożenia, dodatkowe badania nie są wymagane (18).

ULOQ: górna granica oznaczalności.

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system obejmujący klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki, mające informować na temat szkodliwego działania tych substancji chemicznych w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) oraz środowiska (1).

Kategoria 1 wg GHS/CLP ONZ: zob. „Poważne uszkodzenie oczu".

Kategoria 2 wg GHS/CLP ONZ: zob. „Działanie drażniące na oczy".

Brak kategorii wg GHS/CLP ONZ: Substancje chemiczne, które nie spełniają wymogów w zakresie zaklasyfikowania jako należące do kategorii 1 lub 2 (lub kategorii 2A lub 2B wg GHS) wg GHS/CLP ONZ. Określenie używane zamiennie ze sformułowaniem „Niesklasyfikowane".

UPLC: ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa.

▼M8

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

Właściwa metoda badawcza: metoda badawcza, którą uznano za wystarczająco istotną i wiarygodną dla danego celu i która opiera się na uzasadnionych naukowo podstawach. Metoda badawcza nie może zostać uznana za właściwą w sensie absolutnym, ale tylko w odniesieniu do określonego celu (18).

Zweryfikowana metoda badawcza: metoda badawcza, w odniesieniu do której zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zweryfikowana metoda badawcza może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu (18).

Kategoria VRM: zwalidowana metoda referencyjna.

VRM1: badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ jest określone jako zwalidowana metoda referencyjna 1.

VRM2: badanie działania drażniącego na oczy ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ jest określone jako zwalidowana metoda referencyjna 2.

Waga dowodów: proces analizowania mocnych i słabych stron różnych informacji podczas formułowania wniosku dotyczącego potencjalnego zagrożenia stwarzanego przez badaną substancję oraz uzasadnienia takiego wniosku.

▼M8

Dodatek 2

GŁÓWNE ELEMENTY BADAWCZE BADAŃ RHCE ZWERYFIKOWANYCH DO IDENTYFIKACJI SUBSTANCJI CHEMICZNYCH NIEWYMAGAJĄCYCH KLASYFIKACJI I OZNAKOWANIA POD WZGLĘDEM DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO NA OCZY LUB POWODOWANIA POWAŻNYCH USZKODZEŃ OCZU

Elementy badawcze	badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ (VRM 1)		badanie działania drażniącego na oczy ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (VRM 2)	
Protokoły	Ciecze (pipetowane w temperaturze 37 ±1 °C lub niższej przez 15 min)	Ciała stałe (nie można odmierzać pipetą)	Ciecze i substancje lepkie (pipetowane)	Ciała stałe (nie można odmierzać pipetą)
Powierzchnia modelu	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Liczba kontrprób tkanki	Co najmniej 2	Co najmniej 2	Co najmniej 2	Co najmniej 2
Wstępna kontrola zakłócenia barw	50 µl + 1 ml H_2O przez 60 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 % (niebarwne badane substancje chemiczne) lub 50 µl + 2 ml izopropanolu mieszanego przez 2–3 godz. w temperaturze pokojowej (barwne badane substancje chemiczne) → jeżeli gęstość optyczna badanej substancji chemicznej przy 570 ±20 nm po odjęciu gęstości optycznej izopropanolu lub wody wynosi > 0,08 (co odpowiada około 5 % średniej gęstości optycznej kontroli ujemnej), należy przeprowadzić kontrole dostosowane do warunków bytowania.	50 mg + 1 ml H_2O przez 60 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 % (niebarwne badane substancje chemiczne) lub 50 mg + 2 ml izopropanolu mieszanego przez 2–3 godz. w temperaturze pokojowej (barwione i niebarwione badane substancje chemiczne) → jeżeli gęstość optyczna badanej substancji chemicznej przy 570 ±20 nm po odjęciu gęstości optycznej izopropanolu lub wody wynosi > 0,08 (co odpowiada około 5 % średniej gęstości optycznej kontroli ujemnej), należy przeprowadzić kontrole dostosowane do warunków bytowania.	10 µl + 90 µl H_2O mieszane przez 30 ±2 min w temperaturze pokojowej (tj. 18–28 °C) → jeżeli badana substancja chemiczna uległa zabarwieniu, należy wykonać żywe dostosowane kontrole	10 mg + 90 µl H_2O mieszane przez 30 ±2 min w temperaturze pokojowej → jeżeli badana substancja chemiczna uległa zabarwieniu, należy wykonać żywe dostosowane kontrole

▼M8

Elementy badawcze	badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ (VRM 1)		badanie działania drażniącego na oczy ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (VRM 2)	
Wstępna kontrola przed bezpośrednią redukcją MTT	50 µl + 1 ml roztworu MTT 1 mg/ml przez 180 ±15 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 % → jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać kontrole dostosowane do uśmiercenia poprzez zamrożenie (jako kontrolę ujemną stosuje się 50 µl sterylnej wody dejonizowanej w roztworze MTT)	50 mg + 1 ml roztworu MTT 1 mg/ml przez 180 ±15 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 % → jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać dostosowane kontrole uśmiercane przez zamrożenie (jako kontrolę ujemną stosuje się 50 µl sterylnej wody dejonizowanej w roztworze MTT)	30 µl + 300 µl roztworu MTT przez 180 ±15 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 % → jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać kontrole martwych tkanek uśmiercanych wodą (jako kontrolę ujemną stosuje się 30 µl sterylnej dejonizowanej wody w roztworze MTT)	30 mg + 300 µl MTT roztwór 1 mg/ml przez 180 ±15 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 % → jeżeli roztwór zmienia barwę na niebieską lub fioletową, należy wykonać kontrole martwych tkanek uśmiercanych wodą (jako kontrolę ujemną stosuje się 30 µl sterylnej dejonizowanej wody w roztworze MTT)
Obróbka wstępna	20 µl DPBS wolnego od Ca^{2+}/Mg^{2+} przez 30 ±2 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %, chronić przed światłem.	20 µl DPBS wolnego od Ca^{2+}/Mg^{2+} przez 30 ±2 min w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %, chronić przed światłem.	—	—
Dawkowanie i stosowanie	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2), wykorzystując skalibrowane narzędzie (np. wypoziomowanej łyżki skalibrowanej do pomieszczenia 50 mg chlorku sodu).	10 µl DPBS wolnego od Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ±2 µl (60 µl/cm^2) W przypadku substancji lepkich, należy zastosować siatkę nylonową	30 µl DPBS wolnego od Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ±2 mg (60 mg/cm^2)
Czas i temperatura narażania	30 min (±2 min) w podłożu w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %	6 godzin (±0,25 godz.) w podłożu w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %	30 min (±2 min) w podłożu w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %	4 godziny (±0,1 godz.) w podłożu w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %
Płukanie w temperaturze pokojowej	3 razy w 100 ml DPBS wolnego od Ca^{2+}/Mg^{2+}	3 razy w 100 ml DPBS wolnego od Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS wolnego od Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS wolnego od Ca^{2+}/Mg^{2+}
Zanurzanie po zakończeniu narażenia	przez 12 min (±2 min) w podłożu w temperaturze pokojowej	przez 25 min (±2 min) w podłożu w temperaturze pokojowej	przez 30 min (±2 min) w temperaturze 37 °C, atmosferze zawierającej 5 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności w podłożu wynoszącej ≥ 95 %	przez 30 min (±2 min) w podłożu w temperaturze pokojowej

▼M8

Elementy badawcze	badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ (VRM 1)		badanie działania drażniącego na oczy ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (VRM 2)	
Inkubacja po zakończeniu narażenia	120 min (±15 min) w podłożu w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %	18 godz. (±0,25 godz.) w podłożu w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %	brak	18 godz. (±0,5 godz.) w podłożu w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %
Kontrola ujemna	50 µl H_2O Badana równolegle	50 µl H_2O Badana równolegle	30 ±2 µl DPBS wolnego od Ca^{2+}/Mg^{2+} Badana równolegle	30 ±2 µl DPBS wolnego od Ca^{2+}/Mg^{2+} Badana równolegle
Kontrola dodatnia	50 µl octanu metylu Badana równolegle	50 µl octanu metylu Badana równolegle	30 ±2 µl octanu metylu Badana równolegle	30 ±2 µl octanu metylu Badana równolegle
Roztwór MTT	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Czas i temperatura narażania MTT	przez 180 min (±15 min) w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %	przez 180 min (±15 min) w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %	przez 180 min (±15 min) w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %	przez 180 min (±15 min) w temperaturze 37 ±2 °C, atmosferze zawierającej 5 ±1 % CO_2 i w warunkach względnej wilgotności wynoszącej ≥ 95 %
Ekstrahent	2 ml izopropanolu (ekstrakcja z dołu i góry nasadki poprzez przekłucie tkanki)	2 ml izopropanolu (ekstrakcja z dołu nasadki poprzez przekłucie tkanki)	1,5 ml izopropanolu (ekstrakcja z dolnej i górnej części wkładki)	1,5 ml izopropanolu (ekstrakcja z dołu nasadki)
Czas trwania i temperatura ekstrakcji	2–3 godz. ze wstrząsaniem (~120 obr/min) w temperaturze pokojowej lub przez noc w temperaturze 4–10 °C	2–3 godz. ze wstrząsaniem (~120 obr/min) w temperaturze pokojowej lub przez noc w temperaturze 4–10 °C	4 godz. ze wstrząsaniem (~120 obr/min) w temperaturze pokojowej lub bez wstrząsania co najmniej przez noc w temperaturze 4–10 °C	Co najmniej 2 godz. ze wstrząsaniem (~120 obr/min) w temperaturze pokojowej
Odczyt OD	570 nm (550–590 nm) bez filtra referencyjnego	570 nm (550–590 nm) bez filtra referencyjnego	570 nm (540–600 nm) bez filtra referencyjnego	570 nm (540–600 nm) bez filtra referencyjnego
Kontrola jakości tkanki	Poddawanie działaniu 100 µl Triton X-100 0,3 % (obj./obj.) 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Poddawanie działaniu 100 µl Triton X-100 0,3 % (obj./obj.) 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Poddawanie działaniu SDS przez 30 min (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	Poddawanie działaniu SDS przez 30 min (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

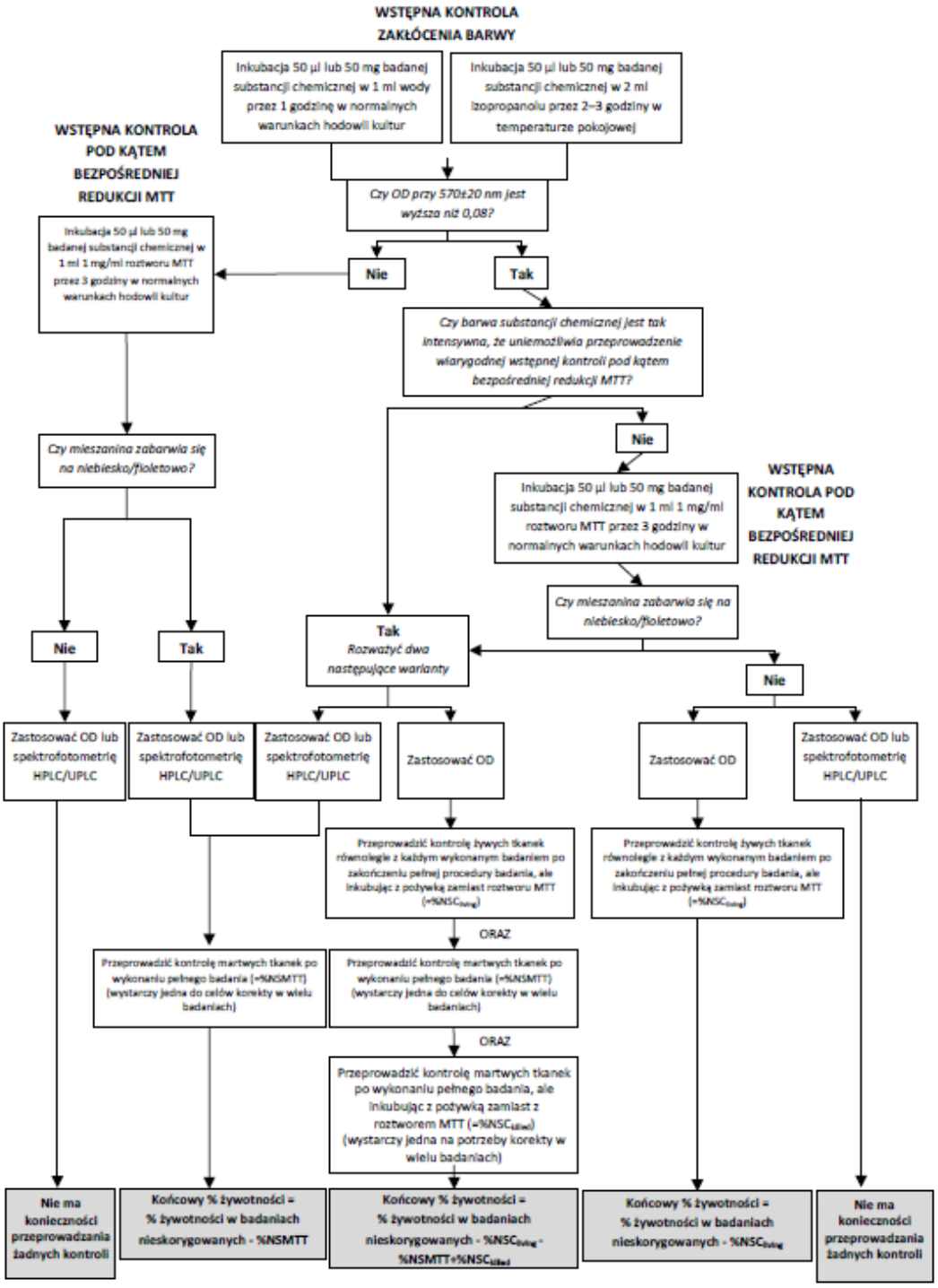
▼M8

Elementy badawcze	badanie działania drażniącego na oczy EpiOcular™ (VRM 1)		badanie działania drażniącego na oczy ludzkiego nabłonka rogówki SkinEthic™ (VRM 2)	
Kryteria dopuszczalności	1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej powinna wynosić > 0,8 i < 2,5 2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 30 min za pomocą kontroli dodatniej, wyrażona jako odsetek kontroli dodatnich, powinna wynosić < 50 % 3. Różnica w żywotności między dwoma kontrpróbami tkanek powinna wynosić mniej niż 20 %.	1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej powinna wynosić > 0,8 i < 2,5 2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 6 godzin za pomocą kontroli dodatniej wyrażona jako odsetek kontroli ujemnych powinna wynosić < 50 % 3. Różnica w żywotności między dwoma kontrpróbami tkanek powinna wynosić mniej niż 20 %.	1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej powinna wynosić > 1,0 i ≤ 2,5 2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 30 min za pomocą kontroli dodatniej wyrażona jako odsetek kontroli dodatnich powinna wynosić ≤ 30 % 3. Różnica w żywotności między dwoma kontrpróbami tkanek powinna wynosić mniej niż 20 %.	1. Średnia wartość OD kontrprób tkanek poddanych działaniu kontroli ujemnej powinna wynosić > 1,0 i ≤ 2,5 2. Średnia żywotność kontrprób tkanek poddawanych narażeniu przez 4 godziny za pomocą kontroli dodatniej wyrażona jako odsetek kontroli ujemnych powinna wynosić ≤ 20 % 3. Różnica w żywotności między dwoma kontrpróbami tkanek powinna wynosić mniej niż 20 %.

▼**M8**

Dodatek 3

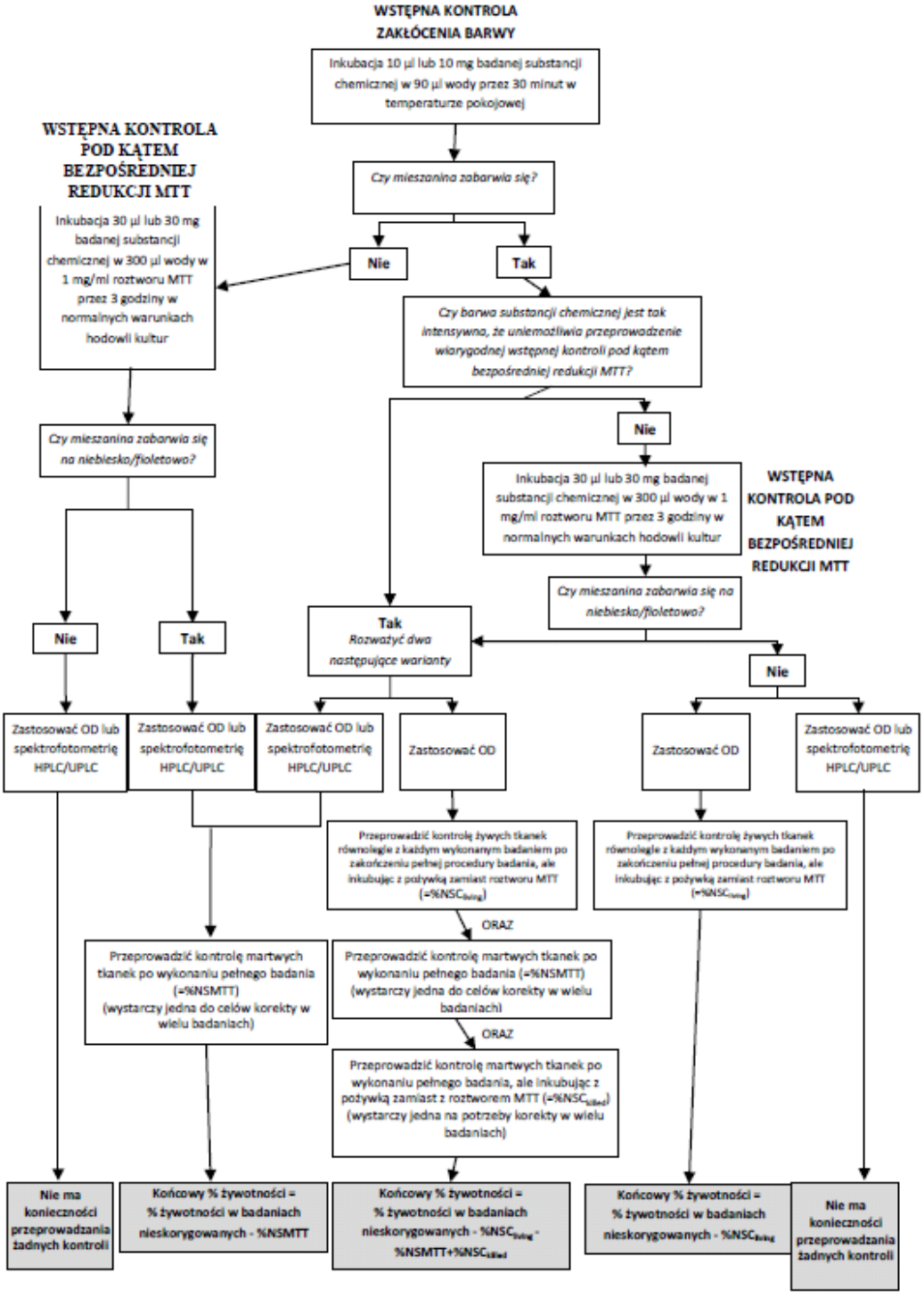
ILUSTRACYJNY SCHEMAT POSTĘPOWANIA, OPIERAJĄC SIĘ NA STANDARDOWEJ PROCEDURZE OPERACYJNEJ ZWALIDOWANEJ METODY WALIDACYJNEJ 1, PRZEDSTAWIA WYTYCZNE ODNOŚNIE DO IDENTYFIKACJI I RADZENIA SOBIE Z BEZPOŚREDNIMI REDUKTORAMI MTT LUB SUBSTANCJAMI CHEMICZNYMI ZAKŁÓCAJĄCYMI BARWĘ



▼**M8**

Dodatek 4

ILUSTRACYJNY SCHEMAT POSTĘPOWANIA, OPIERAJĄC SIĘ NA STANDARDOWEJ PROCEDURZE OPERACYJNEJ ZWALIDOWANEJ METODY WALIDACYJNEJ 2, PRZEDSTAWIA WYTYCZNE ODNOŚNIE DO IDENTYFIKACJI I RADZENIA SOBIE Z BEZPOŚREDNIMI REDUKTORAMI MTT LUB SUBSTANCJAMI CHEMICZNYMI ZAKŁÓCAJĄCYMI BARWĘ



▼**M8**

Dodatek 5

KLUCZOWE PARAMETRY I KRYTERIA DOPUSZCZALNOŚCI SYSTEMU SPEKTROFOTOMETRYCZNEGO HPLC/UPLC DO POMIARU FORMAZANU MTT POBRANEGO Z WYTWORÓW TKANKOWYCH RHCE

Parametr	Protokół wyprowadzony z Wytycznej FDA (36) (38)	Kryteria dopuszczalności
Selektywność	Analiza izopropanolu, żywej ślepej próby (izopropanolu pobranego z żyjącego wytworu tkankowego RhCE niepoddanego działaniu jakichkolwiek substancji), martwej ślepej próby (izopropanolu pobranego z martwego wytworu tkankowego RhCE niepoddanego działaniu jakichkolwiek substancji) oraz barwika (np. błękitu metylenowego)	$Obszar_{interferencja} \leq 20\ \%\ Obszar_{LLOQ}$ ([1])
Precyzja	Kontrole jakości (tj. formazan MTT w stężeniu 1,6 µg/ml, 16 µg/ml oraz 160 µg/ml) w izopropanolu (n = 5)	CV ≤ 15 % lub ≤ 20 % w odniesieniu do LLOQ
Dokładność	Kontrole jakości w izopropanolu (n = 5)	% Dev ≤ 15 % lub ≤ 20 % w odniesieniu do LLOQ
Efekt matrycy	Kontrole jakości na żywej ślepej próbie (n = 5)	85 % ≤ % efektu macierzystego ≤ 115 %
Środek przeniesiony	Analiza izopropanolu według normy ULOQ ([2])	$Obszar_{interferencja} \leq 20\ \%\ Obszar_{LLOQ}$
Odtwarzalność (śródzienna)	3 niezależne krzywe wzorcowe (na podstawie 6 kolejnych roztworów 1/3 formazanu MTT w izopropanolu, poczynając od ULOQ, np. 200 µg/ml); Kontrole jakości w izopropanolu (n = 5)	Krzywe kalibracyjne: % Dev ≤ 15 % lub ≤ 20 % w odniesieniu do LLOQ Kontrole jakości: % Dev ≤ 15 % oraz CV ≤ 15 %
Odtwarzalność (między kolejnymi dniami)	Dzień 1: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3) Dzień 2: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3) Dzień 3: 1 krzywa wzorcowa oraz kontrole jakości w izopropanolu (n = 3)	
Krótkookresowa stabilność formazanu MTT w ekstrakcie tkankowym RhCE	Kontrole jakości na żywej ślepej próbie (n = 3) analizowane w dniu przygotowania oraz po 24 godzinach składowania w temperaturze pokojowej	% Dev ≤ 15 %
W razie potrzeby – długookresowa stabilność formazanu MTT w ekstrakcie tkankowym RhCE	Kontrole jakości w żywej ślepej próbie (n=3) analizowane w dniu przygotowania oraz po kilku dniach przechowywania w temperaturze -20 °C	% Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: dolna granica oznaczalności określona tak, by obejmowała 1-2 % żywotności tkanek, tj. 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: górna granica oznaczalności określona tak, by była co najmniej dwukrotnie wyższa niż najwyższe oczekiwane stężenie formazanu MTT w ekstraktach izopropanolu z kontroli ujemnych (~70 µg/ml w zwalidowanej metodzie referencyjnej), tj. 200 µg/ml.

▼M8

B.70 TESTY *IN VITRO* LUDZKIEGO REKOMBINOWANEGO RECEPTORA ESTROGENOWEGO (hrER) MAJĄCE NA CELU WYKRYCIE SUBSTANCJI CHEMICZNYCH WYKAZUJĄCYCH POWINOWACTWO WIĄZANIA RECEPTORA ESTROGENOWEGO

WPROWADZENIE OGÓLNE

Wytyczna OECD dotycząca badań w oparciu o wyniki

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej dotyczącej badań OECD nr 493 (2015). TG 493 jest wytyczną dotyczącą badań w oparciu o wyniki, która opisuje metodykę ludzkich rekombinowanych testów *in vitro* przeznaczonych do wykrywania substancji wykazujących powinowactwo wiązania receptora estrogenowego (testy wiązania hrER). Zawiera ona dwa testy podobne pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym mające na celu określenie substancji wiążących receptora estrogenowego (tj. receptora estrogenowego alfa), które powinny ułatwiać opracowanie nowych – podobnych lub zmienionych – testów zgodnie z zasadami walidacji określonymi w wytycznych OECD pod tytułem *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (1). W pełni zwalidowane referencyjne metody badań (dodatek 2 i dodatek 3), które stanowią podstawę tej wytycznej dotyczącej badań w oparciu o wyniki, to:

— test *in vitro* Freybergera–Wilsona dotyczący wiązania receptora estrogenowego i wykorzystujący pełnowymiarowy ludzki rekombinowany receptor estrogenowy alfa (2), oraz

— test *in vitro* Instytutu Oceny Chemicznej i Badań (ang. Chemical Evaluation and Research Institute, CERI) dotyczący wiązania receptora estrogenowego i wykorzystujący rekombinowane ludzkie białko domeny wiążącej ligand (2).

Dostępność standardów wykonywania badań (3) umożliwia łatwiejszy rozwój i walidację podobnych metod badawczych dotyczących tego samego zagrożenia punktu końcowego, a także pozwalają one na terminową zmianę wytycznej dotyczącej badań w oparciu o wyniki nr 493, aby do zaktualizowanej wytycznej dotyczącej badań w oparciu o wyniki można było dodać nowe podobne testy. Podobne testy badawcze zostaną jednak dodane wyłącznie po przeglądzie przeprowadzonym przez OECD i po uzgodnieniu przez tę organizację, że standardy wykonywania badań zostały spełnione. Testy zawarte w wytycznej dotyczącej badań nr 493 można stosować w sposób nieograniczony w celu spełnienia wymogów państw członkowskich OECD w zakresie wyników badań dotyczących wiązania receptora estrogenowego przy jednoczesnym korzystaniu z wzajemnego uznawania danych OECD.

Kontekst i zasady dotyczące testów zawartych w niniejszej metodzie badawczej

2. W 1998 r. OECD podjęła działania o wysokim priorytecie, mające na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych dotyczących badań na potrzeby badań klasyfikacyjnych i badań substancji potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. W 2012 r. zmieniono ramy koncepcyjne OECD dotyczące badania i oceny substancji potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Pierwotne i zmienione ramy koncepcyjne uwzględniono jako załączniki do wytycznych o nazwie *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption* (4). Ramy koncepcyjne składają się z pięciu poziomów, a każdy z nich odpowiada innemu poziomowi złożoności biologicznej. Testy wiązania receptora estrogenowego opisane w niniejszej metodzie badawczej należą do poziomu 2, który obejmuje „testy *in vitro* dostarczające danych na temat mechanizmów/ścieżek układu hormonalnego”. Niniejsza metoda badawcza dotyczy testów wiązania receptora *in vitro* stworzonych, aby określić ligandy ludzkiego receptora estrogenowego alfa. α

▼**M8**

3. Wyraźnie wykazano istotność testu wiązania receptora estrogenowego *in vitro* w kontekście funkcji biologicznych. Testy wiązania receptora estrogenowego zaprojektowano w sposób umożliwiający identyfikację substancji chemicznych, które potencjalnie mogą powodować zaburzenia ścieżek hormonu estrogenu, a także w ciągu ostatnich dwóch dekad były w znacznym stopniu stosowane do charakteryzacji rozkładu tkanek receptora estrogenowego oraz do identyfikacji agonistów/antagonistów. Testy te odzwierciedlają interakcję ligand-receptor, która stanowi początkowy etap estrogenowej ścieżki sygnalizacyjnej i jest niezbędna wszystkim kręgowcom przy pełnieniu funkcji reprodukcyjnej.

4. Interakcja estrogenów z receptorami estrogenowymi może wpłynąć na transkrypcję genów regulowanych przez estrogen oraz wywoływać skutki pozagenomowe, które mogą doprowadzić do indukcji lub inhibicji procesów komórkowych, w tym tych koniecznych do proliferacji komórek, prawidłowego rozwoju płodu i funkcji reprodukcyjnej (5)(6)(7). Zakłócenie prawidłowego układu estrogenowego może potencjalnie wywołać niekorzystny wpływ na prawidłowy rozwój (ontogenezę), zdrowie reprodukcyjne i integralność układu rozrodczego. Niewłaściwe sygnalizowanie receptora estrogenowego może doprowadzić do skutków takich jak: zwiększone ryzyko hormonozależnego nowotworu, ograniczona płodność oraz zmiany podczas wzrostu i rozwoju płodowego (8).

5. Testy wiązania *in vitro* opierają się na bezpośredniej interakcji substancji posiadającej określony obszar wiązania ligand receptora regulującego transkrypcję genu. Główny element testu wiązania ludzkiego receptora estrogenowego alfa mierzy zdolność liganda znakowanego izotopem ([^{3}H]17β-estradiolu) do wiązania się z receptorem estrogenowym w obecności zwiększających się stężeń badanej substancji chemicznej (tj. konkurenta). Badane substancje chemiczne o wysokim powinowactwie z receptorem estrogenowym konkurują ze znakowanym izotopem ligandem w niższym stężeniu w porównaniu z substancjami chemicznymi o niższym powinowactwie z receptorem. Niniejszy test składa się z dwóch głównych elementów: doświadczenie dotyczące wiązania nasycenia mające na celu scharakteryzowanie parametrów interakcji receptor-ligand oraz dokumentację swoistości receptora estrogenowego, po którym następuje doświadczenie dotyczące wiązania konkurencyjnego charakteryzujące konkurencję między badaną substancją chemiczną a ligandem znakowanym izotopem w zakresie wiązania z receptorem estrogenowym.

6. Badania walidacyjne dotyczące testów wiązania CERI oraz Freybergera–Wilsona wykazały istotność i wiarygodność tych metod w odniesieniu do ich przeznaczenia (2).

7. Definicje i skróty stosowane w niniejszej metodzie badawczej opisano w dodatku 1.

Zakres i ograniczenia związane z testami wiązania receptora

8. Testy te proponuje się do celów badań przesiewowych i ustalania substancji priorytetowych, ale mogą one dostarczać również informacji na temat zdarzenia inicjacji molekularnej, które można wykorzystać w ramach podejścia opartego na wadze dowodów. Testy te dotyczą wiązania substancji chemicznej do domeny wiążącej ligand receptora estrogenowego alfa w układzie *in vitro*. W związku z tym wyników nie należy ekstrapolować bezpośrednio do złożonej sygnalizacji i regulacji nieuszkodzonego układu hormonalnego *in vivo*.

▼M8

9. Wiązanie naturalnego liganda – 17β-estradiolu – stanowi wstęp do serii zdarzeń molekularnych, które aktywują transkrypcję genów docelowych i docelowo kończy się ono fizjologiczną zmianą (9). W związku z tym wiązanie do domeny wiążącej ligand receptora estrogenowego alfa uznaje się za jeden z kluczowych mechanizmów pośredniczących w zaburzeniach funkcjonowania receptora estrogenowego układu hormonalnego, chociaż istnieją także inne mechanizmy, które mogą wywołać zaburzenia funkcjonowania układu hormonalnego, między innymi (i) interakcje z obszarami receptora estrogenowego α innymi niż kieszeń wiązania ligand, (ii) interakcje z innymi receptorami stosownymi do sygnalizacji estrogenów, receptorami estrogenowymi β i białkami G połączonymi z receptorem estrogenowym, inne receptory i układy enzymatyczne będące w zakresie układu hormonalnego, (iii) synteza hormonów, (iv) aktywacja metaboliczna lub dezaktywacja hormonów, (v) dystrybucja hormonów do tkanek docelowych i (vi) usunięcie hormonów z ciała. Żaden z testów wchodzących w skład niniejszej metody badawczej nie dotyczy tych sposobów działania.

10. Niniejsza metoda badawcza dotyczy zdolności substancji do wiązania się z ludzkim receptorem estrogenowym alfa i nie zachodzi w niej podział na agonistów lub antagonistów receptora estrogenowego alfa. Testy te nie dotyczą ani dalszych zdarzeń niższego stopnia, takich jak transkrypcja genu, ani też zmian psychologicznych. Biorąc pod uwagę, że podczas walidacji wykorzystano jedynie pojedyncze substancja jednoskładnikowe, nie zbadano zastosowania do mieszanin stosowanych w badaniu. Z teoretycznego punktu widzenia testy mogą jednak mieć zastosowanie przy badaniu zarówno substancji wieloskładnikowych, jak i mieszanin. Przed zastosowaniem przedmiotowej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie tej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak, to dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

11. Układy receptorów wolne od komórek nie posiadają wrodzonej zdolności metabolicznej i nie zweryfikowano ich razem z układami enzymów metabolicznych. Możliwe może być jednak włączenie aktywności metabolicznej do projektu badania, aczkolwiek wymagałoby to dołożenia dalszych starań pod względem walidacji.

12. Substancji chemicznych, które mogą spowodować denaturację białka (tj. białka receptorowe) – takich jak środki powierzchniowo czynne lub substancje chemiczne, których pH bufora testowego może ulec zmianie – nie można badać lub można badać je jedynie w stężeniach, w których takie interakcje nie zachodzą. W innym wypadku zakres stężeń, których badania można przeprowadzić w formie testów dotyczących badanej substancji chemicznej jest ograniczany przez jej rozpuszczalność w buforze testowym.

13. Do celów informacyjnych w tabeli 1 przedstawiono wyniki badania 24 substancji, które zbadano stosując dwa w pełni zwalidowane testy opisane w niniejszej metodzie badawczej. 17 z tych substancji sklasyfikowano jako substancje wiążące receptor estrogenowy, a 6 substancji innych niż substancje wiążące na podstawie opublikowanych sprawozdań, w tym testów *in vitro* dotyczących aktywacji transkrypcji lub w teście biologicznego wzrostu macicy (9)(10)(11)(12)(13)(14)(15). Jeżeli chodzi o dane podsumowane w tabeli 1, wyniki obu testów dotyczących klasyfikacji wszystkich substancji do 10^{-4}M były niemal stuprocentowo zgodne, a wszystkie substancje sklasyfikowano prawidłowo jako substancje wiążące lub jako substancje inne niż substancje wiążące receptor estrogenowy. Dodatkowe informacje dotyczące tej grupy substancji, a także dodatkowe substancje zbadane za pomocą testów wiązania receptora estrogenowego podczas badań walidacyjnych zawarto w dodatku 2 (tabele 1, 2 i 3) do standardów wykonywania badań dotyczących testów wiązania hrER (3).

▼M8

Tabela 1

Klasyfikacja substancji jako „substancji wiążących” lub „substancji innych niż substancji wiążących” receptora estrogenowego w testach wiązania Freybergera–Wilsona oraz CERI dotyczących ludzkiego rekombinowanego receptora estrogenowego w porównaniu z przewidywaną reakcją

	Nazwa substancji	NR CAS	Przewidywana reakcja	Test Freybergera–Wilsona		Test CERI		Substancja chemiczna MESH Klasa	Klasa produktowa
				Stężenie Zakres (M)	Klasyfikacja	Stężenie Zakres (M)	Klasyfikacja		
1	17β-estradiol	50-28-2	*Substancja wiążąca*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Substancja wiążąca	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Substancja wiążąca	Steryd	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
2	Noretynodrel	68-23-5	*Substancja wiążąca*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Substancja wiążąca	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Substancja wiążąca	Steryd	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
3	Noretyndron	68-22-4	*Substancja wiążąca*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Substancja wiążąca	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Substancja wiążąca	Steryd	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
4	Ftalan di-n-butylu	84-74-2	*Substancja inna niż substancja wiążąca* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Substancja inna niż substancja wiążąca (**) (+)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Substancja inna niż substancja wiążąca (**) (+)	Węglowodór (cykliczny), ester	Plastyfikator, półprodukt
5	DES	56-53-1	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Węglowodór (cykliczny), fenol	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
6	17α-etynyloestradiol	57-63-6	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Steryd	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
7	mezoheksestrol	84-16-2	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Węglowodór (cykliczny), fenol	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
8	Genisteina	446-72-0	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Węglowodór (heterocykliczny), flawonoid	Produkt naturalny

▼M8

	Nazwa substancji	NR CAS	Przewidywana reakcja	Test Freybergera–Wilsona		Test CERI		Substancja chemiczna MESH Klasa	Klasa produktowa
				Stężenie Zakres (M)	Klasyfikacja	Stężenie Zakres (M)	Klasyfikacja		
9	Equol	531-95-3	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Metabolit fitoestrogenu	Produkt naturalny
10	Butyloparaben (n butyl-4-hydroxy-benzoate)	94-26-8	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Paraben	Konserwant
11	Nonylofenol (mieszanina)	84852-15-3	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Alkilofenol	Związek pośredni
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Chloroorganiczny	Środek owadobójczy
13	Kortykosteron	50-22-6	*Substancja inna niż substancja wiążąca* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Substancja inna niż substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Substancja inna niż substancja wiążąca	Steryd	Produkt naturalny
14	Zearalenon	17924-92-4	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Węglowodór (heterocykliczny), lakton	Produkt naturalny
15	Tamoksyfen	10540-29-1	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Węglowodór (cykliczny)	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
16	5α-dihydrotestosteron	521-18-6	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Steryd, niefenolowy	Produkt naturalny
17	Bisfenol A	80-05-7	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Fenol	Półprodukt
18	4-*n*-heptylphenol	1987-50-4	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Niejednoznaczny ([a])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Alkilofenol	Półprodukt

▼M8

	Nazwa substancji	NR CAS	Przewidywana reakcja	Test Freybergera–Wilsona		Test CERI		Substancja chemiczna MESH Klasa	Klasa produktowa
				Stężenie Zakres (M)	Klasyfikacja	Stężenie Zakres (M)	Klasyfikacja		
19	Kepon (chlordekon)	143-50-0	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Węglowodór (halogenowany)	Pestycyd
20	Benz(a)antracen	56-55-3	*Substancja inna niż substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja inna niż substancja wiążąca ([b])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja inna niż substancja wiążąca ([b])	Węglowodór aromatyczny	Półprodukt
21	Enterolakton	78473-71-9	*Substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja wiążąca	Fitoestrogen	Produkt naturalny
22	Progesteron	57-83-0	*Substancja inna niż substancja wiążąca* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Substancja inna niż substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Substancja inna niż substancja wiążąca	Steryd	Produkt naturalny
23	Oktylotrietoksysilan	2943-75-1	*Substancja inna niż substancja wiążąca*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja inna niż substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Substancja inna niż substancja wiążąca	Silan	Modyfikator powierzchni
24	Atrazyna	1912-24-9	*Substancja inna niż substancja wiążąca* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Substancja inna niż substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Substancja inna niż substancja wiążąca	Związek heterocykliczny	Herbicyd

(*) Granica rozpuszczalności $<1 \times 10^{-4}$M.

(**) Zastosowanie i klasyfikację ftalanu dibutylu (DBP) jako substancji innej niż substancja wiążąca oparto na badaniu do momentu osiągnięcia 10^{-4} M, ponieważ w niektórych laboratoriach podczas badań poprzedzających walidację zaobserwowano, że substancja jest nierozpuszczalna przy 10^{-3}M (np. wykazuje mętność).

(+) W trakcie badania walidacyjnego ftalan dibutylu zbadano pod postacią oznakowanej badanej substancji w stężeniu do 10^{-3}M. W takich warunkach w przypadku części laboratoriów zaobserwowano spadek wiązań radioligandów w najwyższym stężeniu (10^{-3}M) albo niejednoznaczne dopasowanie krzywej. W przypadku tych serii badawczych ftalan dibutylu sklasyfikowano jako substancję „niejednoznaczną" lub „substancję wiążącą" w 3/5 laboratoriów stosujących test CERI oraz w 5/6 laboratoriów stosujących test Freybergera–Wilsona (zob. 2 pozycja bibliografii, sekcje IV.B.3a,b oraz VI.A).

([a]) Klasyfikacja nie była zgodna z klasyfikacją, której się spodziewano. Klasyfikacja 4-*n*-heptylphenolu jako substancji „niejednoznacznej" lub „substancji innej niż substancja wiążąca" przez 3/5 laboratoriów poskutkowała średnią klasyfikacją niejednoznaczną. W toku bardziej szczegółowej inspekcji ujawniono, że było to spowodowane ograniczeniami rozpuszczalności substancji chemicznej, które uniemożliwiały utworzenie kompletnej krzywej wiązania.

([b]) W trakcie badania walidacyjnego benz(a)antracen przeklasyfikowano jako substancję inną niż substancja wiążąca (tj. ujemną), bazując na opublikowanej bibliografii wykazującej, że aktywność estrogenowa *in vitro* przedstawiona w odniesieniu do tej substancji (16) zależy głównie od jej aktywacji metabolicznej(17)(18). Enzymatyczna aktywacja metaboliczna substancji nie byłaby przewidziana w wolnych od komórek testach wiązania hrER, tak jak ma to miejsce w tym międzylaboratoryjnym badaniu walidacyjnym. Klasyfikacja tej substancji jako „substancji innej niż substancja wiążąca" w przypadkach, gdy stosuje się warunki doświadczalne właściwe dla testów Freybergera–Wilsona i CERI, jest zatem prawidłowa.

▼M8

ELEMENTY TESTU WIĄZANIA hrER

Istotne elementy testu

14. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do testów, w których do receptora mogącego pełnić funkcję markera/znacznika testu oraz posiadającego zdolność przemieszczania się wraz ze wzrostem stężenia badanej substancji chemicznej, stosuje się receptor estrogenowy oraz odpowiednio silny ligand. Testy wiązania obejmują dwa główne elementy: 1) wiązanie nasycenia oraz 2) wiązanie konkurencyjne. Test wiązania nasycenia przeprowadza się, aby potwierdzić swoistość i aktywność preparatów receptora, natomiast doświadczenie dotyczące wiązania konkurencyjnego przeprowadza się, aby ocenić zdolność badanej substancji chemicznej do wiązania się z hrER.

Kontrole

15. Należy opisać podstawę proponowanych jednocześnie estrogenów odniesienia i kontroli. Jednoczesne kontrole (z rozpuszczalnikiem (nośnikiem), dodatnie (substancje wiążące się z receptorem estrogenowym; o mocnym i słabym powinowactwie wiązania), ujemne (substancje inne niż substancje wiążące)) w stosownych przypadkach służą jako wskazówka, że test działa w warunkach badania, a kontrole te stanowią podstawę porównań między doświadczeniami; kontrole te wchodzą zwykle w skład kryteriów dopuszczalności danego doświadczenia (1). Pełne krzywe stężeń dla estrogenów odniesienia i kontroli (tj. substancji słabo wiążącej i substancji innej niż substancja wiążąca) w każdej serii badawczej należy stosować na jednej płytce. Wszystkie pozostałe płytki powinny zawierać: 1) wysokie (w przybliżeniu pełne przemieszczenie liganda znakowanego izotopem) i średnie (w przybliżeniu IC_{50}) stężenie każdego z E2 oraz substancji słabo wiążącej w trzech powtórzeniach; 2) kontrolę z rozpuszczalnikiem i wiązanie nieswoiste, każde w trzech powtórzeniach.

Standardowe procedury kontroli jakości

16. Standardowe procedury kontroli jakości należy przeprowadzać tak, jak opisano dla każdego testu w celu zapewnienia czynnych receptorów, właściwych stężeń substancji chemicznych, pułapu tolerancji utrzymującego stabilność przez wiele pasaży oraz zachowania zdolności do uzyskania reakcji wiążących receptor estrogenowy na przestrzeni czasu.

Wykazanie biegłości laboratorium

17. Przed przeprowadzeniem badania nieznanych substancji chemicznych z wykorzystaniem któregoś z testów przeprowadzanych w ramach niniejszej metody badawczej, każde laboratorium powinno wykazać biegłość w stosowaniu testu, przeprowadzając testy nasycenia pozwalające potwierdzić swoistość i aktywność preparatu z receptorem estrogenowym oraz konkurencyjne testy wiązania zawierające estrogen odniesienia i kontrole (substancję słabo wiążącą i substancję inną niż substancja wiążąca). Laboratorium powinno stworzyć bazę danych historycznych, zawierającą wyniki estrogenu odniesienia i kontroli wygenerowanych w ciągu 3–5 niezależnych, przeprowadzonych w różne dni doświadczeń. Doświadczenia te będą stanowić podstawę w przypadku estrogenu odniesienia i kontroli historycznych w przypadku laboratorium, a w przyszłych seriach badawczych będą stosowane jako częściowa ocena dopuszczalności testu.

18. Reaktywność układu badawczego zostanie także potwierdzona za pomocą substancji służących do wykazania biegłości, których wykaz znajduje się w tabeli 2. Wykaz substancji służących do wykazania biegłości stanowi podzbiór substancji odniesienia przedstawionych w standardach wykonywania badań dotyczących badań wiązania receptora estrogenowego (3). Substancje te są dostępne na rynku, należą do klas substancji chemicznych łączących się często z aktywnością wiązania receptora estrogenowego, wykazują odpowiedni zakres siły działania oczekiwanej w przypadku substancji wiążących receptora estrogenowego (tj. od wysokiej do słabej) oraz substancji innych niż substancje wiążące (tj. substancji ujemnych). Zbadane stężenia, w przypadku każdej substancji służącej do wykazania biegłości, powinny wchodzić w zakres określony w tabeli 2. W odniesieniu do każdej substancji należy przeprowadzić co najmniej trzy doświadczenia, a ich wyniki powinny być zgodne z przewidywaną aktywnością substancji chemicznej. Każde doświadczenie należy przeprowadzić niezależnie (tj. w świeżych roztworach receptora, badanych substancji chemicznych i odczynnika), stosując trzy kontrpróby na każde stężenie. Biegłość wykazuje się w drodze poprawnej klasyfikacji (dodatnia/ujemna) każdej substancji służącej do wykazania biegłości. Podczas nauki przeprowadzania testów każdy technik powinien wykonać badanie biegłości.

▼M8

Tabela 2

Wykaz kontroli i substancji służących do wykazania biegłości w odniesieniu do konkurencyjnych testów wiązania hrER ([1])

Nie	Nazwa substancji	NR CAS ([2])	Przewidywana reakcja ([3]) ([4])	Zakres badanych stężeń (M)	Klasa chemiczna MeSH ([5])	Klasa produktowa ([6])
Kontrole (estrogen odniesienia, substancja słabo wiążąca, substancja inna niż substancja wiążąca)						
1	17–εστραδιολ	50-28-2	Substancja wiążąca	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steryd	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
2	Norethynodrel (lub) Noretyndron	68-23-5 (lub) 68-22-4	Substancja wiążąca	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Steryd	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
3	Oktylotrietoksysilan	2943-75-1	Substancja inna niż substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Silan	Modyfikator powierzchni
Substancje służące do wykazania biegłości ([6])						
4	Dietylostylbestrol	56-53-1	Substancja wiążąca	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Węglowodór (cykliczny), fenol	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
5	17α-etynyloestradiol	57-63-6	Substancja wiążąca	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steryd	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
6	mezoheksestrol	84-16-2	Substancja wiążąca	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Węglowodór (cykliczny), fenol	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
7	Tamoksyfen	10540-29-1	Substancja wiążąca	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Węglowodór (cykliczny)	Produkt leczniczy, środek weterynaryjny
8	Genisteina	446-72-0	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Związek heterocykliczny, flawonoid	Produkt naturalny
9	Bisfenol A	80-05-7	Substancja wiążąca	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Fenol	Półprodukt
10	Zearalenon	17924-92-4	Substancja wiążąca	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Związek heterocykliczny, lakton	Produkt naturalny

▼M8

Nie	Nazwa substancji	NR CAS ([2])	Przewidywana reakcja ([3]) ([4])	Zakres badanych stężeń (M)	Klasa chemiczna MeSH ([5])	Klasa produktowa ([6])
11	Butyloparaben	94-26-8	Substancja wiążąca	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Kwas karboksylowy, fenol	Konserwant
12	Atrazyna	1912-24-9	Substancja inna niż substancja wiążąca	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Związek heterocykliczny	Herbicyd
13	Ftalan dibutylu (DBP) ([7])	84-74-2	Substancja inna niż substancja wiążąca ([8])	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Węglowodór (cykliczny), ester	Plastyfikator, półprodukt
14	Kortykosteron	50-22-6	Substancja inna niż substancja wiążąca	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Steryd	Produkt naturalny

([1]) Jeżeli substancja służąca do wykazania biegłości nie jest już dostępna na rynku, można wykorzystać substancję o takiej samej kwalifikacji dotyczącej wiązania receptora estrogenowego i porównywalnej sile działania oraz klasie chemicznej.

([2]) Skróty: CAS RN = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service

([3]) Klasyfikacja jako substancji wiążącej ERα lub substancji innej niż substancja wiążąca podczas badania walidacyjnego dla CERI oraz testu wiązania hrER Freybergera-Wilsona (2).

([4]) Działanie wiążące ER oparto na dokumentach przeglądowych ICCVAM (BRD) w odniesieniu do testów ER Binding i TA (9) oraz na danych empirycznych i innych informacjach uzyskanych z opublikowanych i poddanych przeglądowi badań referencyjnych (10)(11)(12)(13)(14)(15).

([5]) Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy chemicznej przy użyciu Medical Subject Headings (MeSH) amerykańskiej National Library of Medicine, międzynarodowo uznanego znormalizowanego systemu klasyfikacji (dostępnego na stronie: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Substancje przypisano do co najmniej jednej klasy produktowej przy użyciu bazy danych substancji niebezpiecznych amerykańskiej National Library of Medicine (dostępnej na stronie: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

([7]) DPB można stosować jako alternatywną kontrolną substancję inną niż substancja wiążąca zbadaną przy maksymalnym stężeniu wynoszącym 10^{-4} M.

([8]) Granica rozpuszczalności w przypadku tej substancji wynosi 10^{-4} M. Zastosowanie i klasyfikację ftalanu dibutylu (DBP) jako substancji innej niż substancja wiążąca oparto na badaniu do momentu osiągnięcia 10^{-4} M, ponieważ w niektórych laboratoriach podczas badań poprzedzających walidację zaobserwowano, że substancja jest nierozpuszczalna przy 10^{-3}M (np. wykazuje mętność).

▼M8

Badanie rozpuszczalności oraz ustalanie zakresu stężeń badanych substancji chemicznych

19. Należy przeprowadzić badanie wstępne, aby ustalić granicę rozpuszczalności każdej badanej substancji chemicznej oraz określić właściwy zakres stężeń, który zostanie zastosowany przy przeprowadzaniu badania. Granicę rozpuszczalności każdej badanej substancji chemicznej należy początkowo oznaczyć w rozpuszczalniku, a następnie potwierdzić w warunkach testowych. Końcowe stężenie badane w teście nie powinno przekraczać 1 mM. Badanie ustalające zakres dawkowania obejmuje kontrolę z rozpuszczalnikiem wraz z ośmioma seriami stężeń wzrastających w postępie logarytmicznym, począwszy od maksymalnego dopuszczalnego stężenia (np. 1 mM lub niższego, na podstawie granicy rozpuszczalności) oraz odnotowaną obecność zmętnienia lub osadu. Stężenia w drugim i trzecim doświadczeniu należy odpowiednio dostosować, aby lepiej scharakteryzować krzywą zależności stężenie-odpowiedź.

Kryteria dopuszczalności serii badawczej

20. Akceptacji lub odrzucenia serii badawczej dokonuje się na podstawie oceny wyników dotyczących estrogenu i kontroli odniesienia stosowanych w przypadku każdego doświadczenia. Po pierwsze, w przypadku płytki 1 pełne krzywe stężenia dotyczące kontroli odniesienia z każdego doświadczenia powinny odpowiadać miarom efektywności o parametrach dopasowanych do krzywej (np. IC_{50} i krzywej Hilla) opartych na wynikach zgłoszonych w odniesieniu do właściwych protokołów dotyczących testów CERI i Freybergera-Wilsona (dodatek 2 i 3) oraz danym historycznym dotyczącym kontroli otrzymanym od laboratorium przeprowadzającego badanie. Wszystkie kontrole (estrogen odniesienia, substancję słabo wiążącą oraz substancję inną niż substancja wiążąca) należy odpowiednio zaklasyfikować w przypadku każdego doświadczenia. Po drugie, kontrole na wszystkich kolejnych płytkach należy ocenić pod względem zgodności z płytką 1. Należy zastosować wystarczający zakres stężeń badanej substancji chemicznej, aby wyraźnie określić najwyższy punkt konkurencyjnej krzywej wiązania. Zmienność wśród kontrprób przy każdym stężeniu badanej substancji chemicznej, jak również wśród trzech niezależnych serii badawczych powinna być uzasadniona i poparta naukowo. Zdolność do spójnego przeprowadzania testu należy wykazać poprzez opracowanie i utrzymywanie bazy danych historycznych w odniesieniu do estrogenu odniesienia i kontroli. Odchylenia standardowe (SD) lub współczynniki zmienności (CV) dla środków parametrów dopasowania krzywych estrogenu odniesienia i kontrolnej substancji słabo wiążącej z wielu doświadczeń mogą być stosowane jako miara odtwarzalności wewnątrz laboratorium. Dokonując przeglądu wyników dotyczących płytek kontrolnych z każdej serii badawczej, jak również w przypadku każdej badanej substancji chemicznej, należy przyjąć profesjonalny osąd.

Ponadto powinny być spełnione następujące zasady dotyczące kryteriów dopuszczalności:

Dane powinny być wystarczające do przeprowadzenia ilościowej oceny wiązania receptora estrogenowego.

Badane stężenia powinny pozostać w zakresie rozpuszczalności badanej substancji chemicznej.

Analiza danych

21. Określona procedura analizy danych dotyczących wiązania nasycenia oraz wiązania konkurencyjnego powinny być zgodne z kluczowymi zasadami charakteryzowania interakcji receptor-ligand. Zazwyczaj dane dotyczące wiązania nasycenia analizuje się, stosując model regresji nieliniowej, który uwzględnia całkowite i nieswoiste wiązanie. Określając Bmax i Kd konieczna może być korekta obniżenia stężenia ligandu (np. Swillens, 1995 r. (19)). Dane uzyskane w wyniku testów wiązania konkurencyjnego zazwyczaj się przekształca (np. odsetek specyficznego wiązania i stężenie badanej substancji chemicznej (logarytm M)). Szacunki logarytmu (IC_{50}) dla

▼M8

każdej badanej substancji chemicznej należy określić wykorzystując właściwe oprogramowanie dopasowane do krzywej nieliniowej, aby pasowały do równania Hilla o czterech parametrach. Po początkowej analizie należy zastosować parametry dopasowane do krzywej oraz dokonać wizualnego przeglądu stopnia, w jakim dane dotyczące wiązania odpowiadają wygenerowanej krzywej konkurencyjnego wiązania. W niektórych przypadkach konieczne może być przeprowadzenie dodatkowej analizy, aby uzyskać najlepsze dopasowanie do krzywej (np. ograniczenie najwyższego lub najniższego punktu krzywej, zastosowanie zasady 10 %, zob. dodatek 4 i 2 pozycja bibliografii (sekcja III.A.2).

22. Spełnienie kryteriów dopuszczalności (pkt 20) wskazuje, że system testów funkcjonuje prawidłowo, ale nie gwarantuje, że jakiekolwiek konkretne badanie dostarczy dokładnych danych. Powtarzanie się prawidłowych wyników pierwszego badania stanowi najlepszą wskazówkę, że dostarczono dokładnych danych.

Ogólne kryteria interpretacji danych

23. Obecnie nie istnieje powszechnie uzgodniona metoda interpretacji danych dotyczących wiązania receptora estrogenowego. Zarówno jakościowe (np. substancja wiążąca / substancja inna niż substancja wiążąca) jak i ilościowe (np. logarytm IC_{50}, względne powinowactwo wiązania (RBA) itp.) oceny aktywności przekazywanej przez ludzki receptor estrogenowy alfa powinny jednak być oparte na danych empirycznych i rzetelnej ocenie naukowej.

Sprawozdanie z badania

24. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Test:

— zastosowany test;

Kontrola / wzorzec porównawczy / badana substancja chemiczna

— źródło, numer partii, termin przydatności, jeżeli są znane;

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;

— rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane;

— pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, w stosownych przypadkach.

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

▼**M8**

Rozpuszczalnik/nośnik:

— charakterystyka (charakter, dostawca i partia);

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika;

— rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli są znane;

Receptory:

— źródło receptorów (dostawca, nr katalogowy, partia, gatunek receptora, stężenie aktywnego receptora dostarczone przez dostawcę, certyfikat od dostawcy);

— charakterystyka receptorów (w tym wyniki dotyczące wiązania nasycenia): Kd, Bmax;

— przechowywanie receptorów;

— ligand znakowany izotopem promieniotwórczym:

— dostawca, nr katalogowy, partia, określone działanie.

Warunki badania:

— granica rozpuszczalności w warunkach testowych;

— skład bufora wiązania;

— stężenie receptora;

— stężenie znacznika (tj. ligandu znakowanego izotopem promieniotwórczym);

— stężenia badanej substancji chemicznej;

— odsetek nośnika w teście końcowym;

— temperatura i czas inkubacji;

— metoda rozdzielenia związanych/wolnych ligandów;

— dodatnie i ujemne kontrole / substancje odniesienia;

— kryteria uznania badania za dodatnie, ujemne lub niejednoznaczne.

Kontrola dopuszczalności:

— rzeczywiste wartości IC_{50} i krzywej Hilla w odniesieniu do jednoczesnych kontroli dodatnich / substancji odniesienia.

Wyniki:

— surowe dane dotyczące związanych i wolnych ligandów;

— w stosownych przypadkach kontrola potwierdzająca denaturację;

— jeżeli istnieje, najniższe stężenie efektywne (LEC);

— wartości względnego powinowactwa wiązania lub IC_{50}, w stosownych przypadkach;

— w stosownych przypadkach zależność stężenie-odpowiedź;

— analizy statystyczne, jeśli takie istnieją, wraz z miarą błędu i wiarygodności (np. SEM, SD, CV lub 95 % CI) oraz opisem sposobu uzyskania tych wartości;

▼**M8**

Omówienie wyników:

— zastosowanie zasady 10 %.

Wniosek

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 34. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(2) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)* [W:] Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 226. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(3) OECD (2015). *Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)* [W:] Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 222. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(4) OECD (2012). *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption.* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 150. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(5) Cavailles V. (2002). *Estrogens and Receptors: an Evolving Concept*, „Climacteric" nr 5, suplement 2, s. 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" nr 16(4), s. 1073–1089.

(7) Younes M. i Honma N. (2011). *Estrogen Receptor Beta*. „Arch. Pathol. Lab. Med"., 135(1): s. 63–66.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). *Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement,* „Endo Rev" nr 30(4), s. 293–342.

(9) ICCVAM (2002). *Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors:* In Vitro *Estrogen Receptor Binding Assays*. (Publikacja NIH 2002 nr 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, Karolina Północna.

(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" nr 22(1), s. 225–231.

(13) OECD (2007). *Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents* [W:] Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 67. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

▼**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): Japonia, s. 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" nr 146, s. 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" nr 180, s. 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." nr 196, s. 58–67.

(18) Santodonato, J. (1997). *Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity.* [W:] „Chemosphere" nr 34, s. 835–848.

(19) Swillens S (1995). *Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis.* „Mol Pharmacol" nr 47(6), s. 1197–1203.

▼M8

Dodatek 1

DEFINICJE I SKRÓTY

Zasada 10 %: Możliwość wykluczenia z analiz punktów danych, w przypadku których średnia kontrprób w odniesieniu do odsetka określonego wiązania [^{3}H]17β-estradiolu wynosi 10 % lub więcej niż zaobserwowano w przypadku średniej wartości przy niższym stężeniu (zob. dodatek 4).

Kryteria dopuszczalności: minimalne normy dotyczące przeprowadzania kontroli doświadczalnych i wzorców referencyjnych. Aby doświadczenie zostało uznane za ważne, należy spełnić wszystkie kryteria dopuszczalności.

Dokładność (zgodność): stopień zgodności wyników testu z przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności testu i jeden z aspektów jego istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na określenie odsetka prawidłowych wyników testu (1).

CF: ramy koncepcyjne OECD dotyczące testowania i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

CV: Współczynnik zmienności

E2: 17β-estradiol

ED: zaburzenia endokrynologiczne

hERα: ludzki receptor estrogenowy alfa

ER: receptor estrogenowy

Aktywność estrogenna: zdolność substancji chemicznej do naśladowania 17β-estradiolu w jego zdolności do wiązania się z receptorami estrogenowymi. Wiązanie z ludzkim receptorem estrogenowym alfa można wykryć za pomocą niniejszej metody badawczej.

IC50: połowa maksymalnego stężenia efektywnego badanej hamującej substancji chemicznej.

ICCVAM: Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych.

Odtwarzalność międzylaboratoryjna: miara zakresu, w jakim różne wykwalifikowane laboratoria, przy użyciu tego samego protokołu i testując tę samą badaną substancję, mogą uzyskać jakościowo i ilościowo podobne wyniki. Odtwarzalność międzylaboratoryjna jest ustalana w ramach procesów poprzedzających walidację i obejmujących walidację i wskazuje, w jakim stopniu test można z powodzeniem przekazywać między laboratoriami: nazywana jest również odtwarzalnością międzylaboratoryjną (1).

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna: ustalenie stopnia, w jakim wykwalifikowani pracownicy w tym samym laboratorium mogą z powodzeniem odtworzyć wyniki, stosując szczegółowy protokół w różnych momentach. Nazywana również „odtwarzalnością laboratoryjną" (1).

▼M8

LEC: najniższe stężenie efektywne to najniższe stężenie badanej substancji chemicznej, które powoduje reakcję (tj. najniższe stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym krotność indukcji statystycznie różni się od równoległej grupy kontrolnej nośnika).

Badanie me-too: potoczne określenie testu, które jest strukturalnie i funkcjonalnie podobne do zwalidowanej i zaakceptowanej referencyjnej metody badania. Stosowane zamiennie z podobną metodą badań.

PBTG: wytyczne dotyczące badań w oparciu o wyniki

Standardy wykonywania badań (PS): normy oparte na zwalidowanej metodzie badawczej, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanego testu, który jest podobny do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: 1) istotne elementy testu; 2) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia, wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania akceptowalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz 3) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników uzyskanych dla zwalidowanej metody badania, który proponowany test powinien osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia (1).

Substancje służące do wykazania biegłości: podzbiór substancji odniesienia zawartych w standardach wykonywania badań, które mogą być stosowane przez laboratoria w celu wykazania kompetencji technicznych za pomocą znormalizowanego testu. Kryteria kwalifikacji w przypadku tych substancji obejmują zazwyczaj takie czynniki, jak to, że reprezentują one zakres reakcji, są dostępne na rynku i że dostępne są wysokiej jakości dane porównawcze.

Biegłość: wykazana zdolność do prawidłowego wykonania testu przed badaniem nieznanych substancji.

Estrogen odniesienia: 17β-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referencyjne metody badawcze: testy oparte na PBTG 493.

RBA: względne powinowactwo wiązania. Względne powinowactwo wiązania oblicza się jako odsetek logarytmu (IC_{50}) substancji w stosunku do logarytmu (IC_{50}) 17β-estradiolu

Istotność: opis powiązania testu z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest on znaczący i użyteczny z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim test pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć biologiczny skutek będący przedmiotem zainteresowania. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) testu (1).

Wiarygodność: miara zakresu, w jakim test może zostać wykonany w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jego przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją w drodze obliczenia odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej.

SD: odchylenie standardowe.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Zweryfikowana metoda badawcza: test, w odniesieniu do którego zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zweryfikowana metoda badawcza może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu (1).

Walidacja: proces, za pomocą którego ustalana jest wiarygodność i adekwatność danego podejścia, metody, testu, procesu lub oceny w określonym celu (1).

▼**M8**

Dodatek 2

TEST IN VITRO NASYCENIA I WIĄZANIA KONKURENCYJNEGO RECEPTORA ESTROGENOWEGO (ERα) FREYBERGERA–WILSONA WYKORZYSTUJĄCY PEŁNOWYMIAROWY REKOMBINOWANY ERα

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)

1. Niniejszy test nasycenia i wiązania konkurencyjnego receptora estrogenowego (ERα) *in vitro* wykorzystuje pełnowymiarowy ludzki receptor ERαα (hrERα), który jest wytwarzany w komórkach owadów zakażonych bakulowirusem i z nich izolowany. Protokół, opracowany przez Freybergera i Wilsona, został poddany międzynarodowemu wielolaboratoryjnemu badaniu walidacyjnemu (2), które wykazało jego adekwatność i wiarygodność dla zamierzonego celu testu.

2. Test ten jest procedurą klasyfikacyjną służącą do identyfikacji substancji, które mogą wiązać się z pełnowymiarowym hrERα. Służy on do określenia zdolności badanej substancji chemicznej do konkurowania z 17β-estradiolem w zakresie wiązania z hrERα. Ilościowe wyniki testu mogą obejmować IC_{50} (miara stężenia badanej substancji chemicznej potrzebnego do wyparcia połowy [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα) i względne powinowactwa wiązania badanych substancji chemicznych w odniesieniu do hrERα w porównaniu z 17β-estradiolem. Do celów klasyfikacji substancji chemicznych akceptowalne wyniki testów jakościowych mogą obejmować klasyfikację badanych substancji chemicznych jako substancji wiążących hrERα, substancji innych niż substancja wiążąca lub niejednoznacznych w oparciu o kryteria opisane dla krzywych wiązania.

3. W teście wykorzystuje się ligand promieniotwórczy, który wymaga zezwolenia na stosowanie materiałów promieniotwórczych przez laboratorium. Wszystkie procedury dotyczące radioizotopów i niebezpiecznych substancji chemicznych powinny być zgodne z przepisami i procedurami opisanymi w prawodawstwie krajowym.

4. Przed rozpoczęciem stosowania tego badania do celów regulacyjnych należy zapoznać się z sekcjami „**WPROWADZENIE OGÓLNE**” oraz „**ELEMENTY TESTU WIĄZANIA hrER**”. Definicje i skróty stosowane w niniejszej wytycznej dotyczącej badań opisano w dodatku 1.

ZASADY WYKONANIA TESTU (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)

5. W teście wiązania hrERα mierzy się zdolność znakowanego izotopem liganda ([^{3}H]17β-estradiolu) do wiązania się z receptorem estrogenowym w obecności zwiększających się stężeń badanej substancji chemicznej (tj. konkurenta). Badane substancje chemiczne o wysokim powinowactwie z receptorem estrogenowym konkurują ze znakowanym izotopem ligandem w niższym stężeniu w porównaniu z substancjami chemicznymi o niższym powinowactwie z receptorem.

6. Niniejszy test składa się z dwóch głównych elementów: doświadczenie dotyczące wiązania nasycenia mające na celu scharakteryzowanie parametrów interakcji receptor-ligand, po którym następuje doświadczenie dotyczące wiązania konkurencyjnego, charakteryzujący konkurencję pomiędzy badaną substancją chemiczną a znakowanym izotopem ligandem w zakresie wiązania z receptorem estrogenowym.

7. Celem doświadczenia dotyczącego wiązania nasycenia jest scharakteryzowanie konkretnej partii receptorów pod kątem powinowactwa wiązania i ich liczby w ramach przygotowania do doświadczenia dotyczącego wiązania konkurencyjnego. W doświadczeniu dotyczącym wiązania nasycenia mierzy się, w warunkach równowagi, powinowactwo stałego stężenia receptora estrogenowego w odniesieniu do jego naturalnego ligandu (reprezentowanego przez stałą dysocjacji, Kd) oraz stężenie obszarów czynnego receptora (Bmax).

▼M8

8. W doświadczeniu dotyczącym konkurencyjnego wiązania mierzy się powinowactwo substancji do konkurowania z [^{3}H]17β-estradiolem o wiązanie z receptorem estrogenowym. Powinowactwo jest określa się ilościowo za pomocą stężenia badanej substancji chemicznej, która w stanie równowagi hamuje 50 % specyficznego wiązania [^{3}H]17β-estradiolu (nazywanego „stężeniem hamującym 50 %" lub IC_{50}). Można je również ocenić za pomocą względnego powinowactwa wiązania (RBA, w stosunku do IC_{50} estradiolu mierzonego oddzielnie w tej samej serii badawczej). W doświadczeniu dotyczącym konkurencyjnego wiązania mierzy się wiązanie [^{3}H]17β-estradiolu przy stałym stężeniu w obecności szerokiego zakresu (ośmiu rzędów wielkości) stężeń badanych substancji chemicznych. Dane są następnie dopasowywane, na ile to możliwe, do postaci równania Hilla (Hill 1910), które opisuje przemieszczenie radioligandu przez jednoobszarową konkurencyjną substancję wiążącą. Zakres przemieszczenia estradiolu znakowanego izotopem w stanie równowagi jest wykorzystywany do scharakteryzowania badanej substancji chemicznej jako substancji wiążącej, substancji innej niż substancja wiążąca lub generującej reakcję niejednoznaczną.

PROCEDURA

Wykazanie dopuszczalnej efektywności białka hrERα

9. Przed rutynowym wykonaniem testów nasycenia i wiązania konkurencyjnego należy wykazać, że efektywność każdej nowej partii hrERα w laboratorium, w którym będzie używana, jest prawidłowa. W celu zademonstrowania efektywności należy zastosować dwuetapowy proces. Etapy te są następujące:

— Przeprowadzenie testu wiązania nasycenia [^{3}H]-17β-estradiolu w celu wykazania swoistości i nasycenia hrERα. Analiza regresji nieliniowej tych danych (np. BioSoft; McPherson 1985; Motulsky 1995), a następnie wykres Scatcharda powinien dokumentować powinowactwo wiązania hrERα [^{3}H]-17β-estradiolu (Kd) i liczbę receptorów (Bmax) w odniesieniu do każdej partii hrERα.

— Wykonanie testu wiązania konkurencyjnego przy użyciu substancji kontrolnych (estrogen odniesienia (17β-estradiol)), substancji słabo wiążącej (np. noretynodrel lub noretyndron) oraz substancji innej niż substancja wiążąca (oktylotrietoksysilan, OTES). Każde laboratorium powinno stworzyć bazę danych historycznych w celu udokumentowania spójności IC_{50} i innych istotnych wartości dla estrogenów odniesienia i substancji słabo wiążących między doświadczeniami i różnymi partiami hrERα. Parametry krzywych konkurencyjnego wiązania dla substancji kontrolnych powinny mieścić się w granicach 95 % przedziału ufności (zob. tabela 1), które zostały opracowane przy wykorzystaniu danych z laboratoriów uczestniczących w badaniu walidacyjnym w odniesieniu do niniejszego testu (2).

Tabela 1

Kryteria efektywności opracowane dla estrogenów odniesienia i substancji słabo wiążących, test wiązania FW hrER

Substancja	Parametr	Wartość średnia ([a])	Odchylenie standardowe (n)	Przedziały ufności ([b]) 95 %	
				Dolna wartość graniczna	Górna wartość graniczna
17β-estradiol	Najwyższa wartość (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Najniższa wartość (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Krzywa Hilla	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92 ()	0,18 (67)	-8,97	-8,88

▼M8

Substancja	Parametr	Wartość średnia [a]	Odchylenie standardowe (n)	Przedziały ufności [b] 95 %	
				Dolna wartość graniczna	Górna wartość graniczna
Noretynodrel	Najwyższa wartość (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Najniższa wartość (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Krzywa Hilla	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	$LogIC_{50}$ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretyndron[c]	Najwyższa wartość (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Najniższa wartość (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Krzywa Hilla	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	$LogIC_{50}$ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

([a]) Średnia (n) ± odchylenie standardowe (SD) zostały obliczone przy użyciu szacunków parametrów dopasowania krzywej (4-parametrowe równanie Hilla) dla kontrolnych serii badawczych wykonanych w czterech laboratoriach podczas badania walidacyjnego (zob. załącznik N do 2. pozycji bibliografii).

([b]) 95 % przedziały ufności są podane jako wskazówka w odniesieniu do kryteriów dopuszczalności.

([c]) Testowanie noretyndronu było opcjonalne w przypadku podzadania 4 przeprowadzonego podczas badania walidacyjnego (zob. 2. pozycja bibliografii, zob. podzadanie 4). W związku z tym średnią ± SD (n) obliczono przy użyciu szacunków dopasowania krzywej (4-parametrowe równanie Hilla) dla kontrolnych serii badawczych wykonanych w dwóch laboratoriach.

Zakres IC_{50} będzie zależał od Kd preparatu receptora i stężenia znakowanego izotopem ligandu używanego w każdym laboratorium. *Dopuszczalna będzie odpowiednia korekta zakresu* IC_{50} *na podstawie warunków stosowanych do przeprowadzenia testu.*

Wykazanie biegłości laboratorium

10. Zob. pkt 17 i 18 oraz tabela 2 w rozdziale „**ELEMENTY TESTU WIĄZANIA hrER**” w niniejszej metodzie badawczej. Każdy test (nasycenia i wiązania konkurencyjnego) powinien składać się z trzech niezależnych serii badawczych (tj. ze świeżymi rozcieńczeniami receptora, substancji chemicznych i odczynników) w różnych dniach, a każda seria badawcza powinna obejmować trzy kontrpróby.

Określanie stężenia receptora (hrERα)

11. Stężenie czynnego receptora różni się nieznacznie w zależności od partii i warunków składowania. Z tego powodu należy określić stężenie czynnego receptora otrzymanego od dostawcy. Pozwoli to uzyskać odpowiednie stężenie aktywnego receptora w serii badawczej.

12. W warunkach odpowiadających konkurencyjnym wiązaniom (tj. 1 nM [^{3}H]-estradiolu), nominalne stężenia 0,25, 0,5, 0,75 i 1 nM receptora powinny być inkubowane przy braku (wiązanie całkowite) i obecności (wiązanie nieswoiste) 1 µM nieoznakowanego estradiolu. Określone wiązanie, obliczone jako różnica wiązania całkowitego i nieswoistego, jest wykreślane w funkcji nominalnego stężenia receptora. Stężenie receptora, które daje określone wartości wiązania odpowiadające 20 % dodanego oznaczenia izotopem, jest związane z odpowiadającym mu nominalnym stężeniem receptora, a stężenie receptora powinno być wykorzystywane w doświadczeniach dotyczących nasycenia i konkurencyjnego wiązania. Często końcowe stężenie hrER wynoszące 0,5 nM jest zgodne z tym warunkiem.

▼M8

13. Jeżeli kryterium 20 % nie może być wielokrotnie spełnione, należy sprawdzić, czy w zestawie doświadczenia nie ma potencjalnych błędów. Nieosiągnięcie kryterium 20 % może wskazywać, że w partii rekombinowanej jest bardzo mało czynnego receptora, w związku z czym należy rozważyć zastosowanie innej partii receptora.

Test nasycenia

14. Osiem wzrastających stężeń [^{3}H]17β-estradiolu należy oceniać trzykrotnie, w następujących trzech warunkach (zob. tabela 2):

— przy braku nieoznakowanego 17β-estradiolu i w obecności receptora estrogenowego. Jest to wyznaczenie wiązania całkowitego przez pomiar radioaktywności w dołkach, w których znajduje się tylko [^{3}H]17β-estradiol.

— W obecności 1 000-krotnego przekroczenia stężenia nieoznakowanego 17β-estradiolu nad oznakowanym 17β-estradiolem i obecności receptora estrogenowego. Zamierzeniem tego warunku jest nasycenie aktywnych obszarów wiązania nieoznakowanym 17β-estradiolem, a w wyniku pomiaru radioaktywności w dołkach, określenie wiązania nieswoistego. Każdy pozostały gorący estradiol, który może wiązać się z receptorem uznaje się za wiążący w nieswoistym obszarze, ponieważ zimny estradiol powinien być w tak wysokim stężeniu, aby wiązał się ze wszystkimi dostępnymi swoistymi obszarami na receptorze.

— Przy braku nieoznakowanego 17β-estradiolu i braku receptora estrogenowego (określenie całkowitej radioaktywności).

Przygotowanie roztworów [^{3}H]-17β-estradiolu i nieoznakowanego 17β-estradiolu

15. Należy przygotować rozcieńczenia [^{3}H]-17β-estradiolu przez dodanie buforu testowego do roztworu podstawowego 12 nM [^{3}H]-17β-estradiolu, aby uzyskać stężenia początkowo w zakresie od 0,12 nM do 12 nM. Dodają 40 µl tych roztworów do odpowiednich dołków testowych płytki 96-dołkowej (w ostatecznej objętości 160 µl), uzyskuje się końcowe stężenia testowe w zakresie od 0,03 do 3,0 nM. Przygotowanie buforu testowego, roztworu podstawowego [^{3}H]-17β-estradiolu oraz rozcieńczeń i określenie stężeń są szczegółowo opisane w protokole Freybergera–Wilsona (2).

16. Należy przygotować rozcieńczenia etanolowych roztworów 17β-estradiolu przez dodanie buforu testowego, aby uzyskać osiem wzrastających stężeń, początkowo w zakresie od 0,06 µM do 6 µM. Poprzez dodanie 80 µl tych roztworów do odpowiednich dołków testowych płytki 96-dołkowej (w ostatecznej objętości 160 µl), uzyskuje się końcowe stężenia testowe w zakresie od 0,03 µM do 3,0 µM. Ostateczne stężenie nieoznakowanego 17β-estradiolu w poszczególnych dołkach testowych z nieswoistymi wiązaniami powinno być 1 000-krotnie większe od oznakowanego stężenia [^{3}H]-17β- estradiolu. Przygotowanie rozcieńczeń nieoznakowanego 17β-estradiolu jest szczegółowo opisane w protokole Freybergera–Wilsona (2).

17. Należy stosować nominalne stężenie receptora, które daje specyficzne wiązanie 20±5 % (zob. pkt 12–13). Roztwór hrERα należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

18. Płytki 96-dołkowe są przygotowywane w sposób przedstawiony w tabeli 2, z 3 kontrpróbami na stężenie. Przykład stężenia płytek i przypisania objętości [^{3}H]-17β-estradiolu, nieoznakowanego 17β-estradiolu, buforu i receptora przedstawiono w dodatku 2.2.

▼M8

Tabela 2

Rozkład na mikropłytce do testu wiązania nasycenia

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E_2 + ER			Wiązanie całkowite (rozpuszczalnik)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 μM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 μM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 μM E_2			0,10 nM [3H] E_2 + ER + 0,10 μM E_2			Wiązanie nieswoiste
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 μM E_2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + + 3,0 μM E_2			
F													
G													
H													

[^{3}H] E2: [^{3}H]-17β-estradiol
ER: receptor estrogenowy
E_2: nieoznakowany 17β-estradiol

19. Mikropłytki testowe należy inkubować w temperaturze 2–8 °C przez 16–20 godzin i umieszczane na rotatorze podczas okresu inkubacji.

Pomiar [^{3}H]-17β-estradiolu związanego z hrERα

20. [^{3}H]-17β-estradiol związany z hrERα należy oddzielić od wolnego [^{3}H]-17β-estradiolu poprzez dodanie 80 μl zimnej zawiesiny DCC do każdego dołka, potrząsanie mikropłytkami przez 10 minut i odwirowywanie przez 10 minut z prędkością około 2 500 obr./min. Aby zminimalizować dysocjację związanego [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα podczas tego procesu, jest niezwykle ważne, aby bufory i dołki testowe były utrzymywane w temperaturze 2–8 °C i aby każdy etap był przeprowadzany szybko. Wytrząsarka do mikropłytek jest niezbędna do wydajnej i szybkiej obróbki płytek.

21. 50 μl supernatantu zawierającego [^{3}H]-17β-estradiol związany z hrERα należy wówczas podnieść z najwyższą ostrożnością, aby uniknąć zanieczyszczenia dołków na skutek dotknięcia DCC, i umieścić na drugiej mikropłytce.

22. 200 μl płynu scyntylacyjnego, zdolnego do przekształcenia energii kinetycznej emisji jądrowej w energię świetlną, należy następnie dodać do każdego dołka (A1–B12 i D1 do E12). Dołki G1–H12 (zidentyfikowane jako całkowita liczba rozpadów na minutę) reprezentują serie stężeń wzrastających w postępie geometrycznym [^{3}H]-17β-estradiolu (40 μl), które powinny być dostarczane bezpośrednio do płynu scyntylacyjnego w dołkach płytki pomiarowej, jak wskazano w tabeli 3, tj. dołki te zawierają tylko 200 μl płynu scyntylacyjnego i odpowiednie rozcieńczenie [^{3}H]-17β-estradiolu. Pomiary te pokazują, ile [^{3}H]-17β-estradiolu wyrażonych za pomocą liczby rozpadów na minutę dodano do każdego zestawu dołków w celu uzyskania wiązania całkowitego i wiązania nieswoistego.

▼M8

Tabela 3

Rozkład na mikropłytce do testu wiązania nasycenia, pomiar radioaktywności

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E_2 + ER			Wiązanie całkowite (rozpuszczalnik)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 μM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 μM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 μM E_2			0,10 nM [3H] E_2 + ER + 0,10 μM E_2			Wiązanie nieswoiste
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 μM E_2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + + 3,0 μM E_2			
F													
G	0,03 nM [^{3}H] E_2 (DPM ogółem)			0,06 nM [^{3}H] E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2			0,10 nM [^{3}H] E_2			DPM (*) ogółem
H	0,30 nM [^{3}H] E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2			

[^{3}H] E2: [^{3}H]-17β-estradiol

ER: receptor estrogenowy

E2: nieoznakowany 17β-estradiol

DPM: liczba rozpadów na minutę

(*) Gorące serie stężeń wzrastających w postępie geometrycznym estradiolu oznakowanego [^{3}H] należy dodać bezpośrednio do 200 μl płynu scyntylacyjnego w dołkach G1–H12.

23. Pomiar powinien rozpocząć się z opóźnieniem co najmniej 2 godzin, a czas liczenia powinien wynosić 40 minut na dołek. Do określenia liczby rozpadów na minutę na dołek z korekcją tłumienia należy zastosować licznik scyntylacyjny do mikropłytek. Alternatywnie, jeżeli licznik scyntylacyjny dla mikropłytki nie jest dostępny, próbki mogą być mierzone w konwencjonalnym liczniku. W tych warunkach można rozważyć skrócenie czasu liczenia.

Test wiązania konkurencyjnego

24. W teście wiązania konkurencyjnego mierzy się wiązanie pojedynczego stężenia [^{3}H]17β-estradiolu w obecności zwiększających się stężeń badanej substancji chemicznej. Przy każdym stężeniu w ramach jednej serii badawczej należy zastosować trzy równoległe kontrpróby. Ponadto dla każdej badanej substancji chemicznej należy wykonać trzy niejednoczesne serie badawcze. Test powinien zostać przeprowadzony na jednej płytce 96-dołkowej lub na większej ich liczbie.

Kontrole

25. Podczas przeprowadzania testu w każdym doświadczeniu należy uwzględnić równoczesny rozpuszczalnik i kontrole (tj. estrogen odniesienia, substancję słabo wiążącą oraz substancję inną niż substancja wiążąca). Pełne krzywe stężeń dla estrogenów odniesienia i kontroli (tj. substancji słabo wiążącej i substancji innej niż substancja wiążąca) w każdej serii badawczej należy stosować na jednej płytce. Wszystkie pozostałe płytki powinny zawierać (i) wysokie (maksymalne przemieszczenie) i średnie (około IC_{50}) stężenie każdego z E2 oraz substancji słabo wiążącej w trzech powtórzeniach; (ii) kontrolę z rozpuszczalnikiem i wiązanie nieswoiste, każde co najmniej w trzech powtórzeniach. Procedury przygotowania buforu testowego, kontroli, [^{3}H]-17β-estradiolu, hrERα i roztworów badanych substancji chemicznych opisano w 2 pozycji bibliografii (załącznik K, zob. Protokół testu Freybergera–Wilsona).

▼**M8**

Kontrola z rozpuszczalnikiem:

26. Kontrola z rozpuszczalnikiem wskazuje, że rozpuszczalnik nie wchodzi w interakcję z układem badawczym, a także umożliwia zmierzenie wiązania całkowitego (TB). Preferowanym rozpuszczalnikiem jest etanol. W przypadku gdy najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej nie jest rozpuszczalne w etanolu, alternatywnie można zastosować sulfotlenek dimetylowy. Stężenie etanolu lub sulfotlenku dimetylowego, jeżeli go zastosowano, w dołkach testu końcowego wynosi 1,5 % i nie może przekraczać 2 %.

Kontrola z buforem:

27. Kontrola z buforem (BC) nie powinna zawierać rozpuszczalnika ani badanej substancji chemicznej, ale wszystkie inne elementy testu. Wyniki kontroli z buforem porównuje się z wynikami kontroli z rozpuszczalnikiem w celu sprawdzenia, czy zastosowany rozpuszczalnik nie ma wpływu na system testu.

Substancja silnie wiążąca (estrogen odniesienia)

28. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) jest endogennym ligandem i tworzy wiązanie o wysokim powinowactwie z receptorem estrogenowym, podtyp alfa. Dla każdego testu wiązania konkurencyjnego hrERα należy przygotować krzywą wzorcową z użyciem nieoznakowanego 17β-estradiolu, aby w tym samym laboratorium umożliwić ocenę zmienności podczas wykonywania testu na przestrzeni czasu. W etanolu należy przygotować osiem roztworów nieoznakowanego 17β-estradiolu o stężeniach w dołkach testowych w zakresie od 100 nM do 10 pM (-7[logM] do -11[logM]), w następujących odstępach: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). Najwyższe stężenie nieoznakowanego 17β-estradiolu (1 μM) służy również jako wskaźnik nieswoistego wiązania. Stężenie to wyróżnia się etykietą „NSB” w tabeli 4, mimo że jest ono również częścią krzywej wzorcowej.

Substancja słabo wiążąca

29. Należy uwzględnić substancję słabo wiążącą (noretynodrel (CAS 68-23-5) lub noretyndron (CAS 68-22-4)) w celu wykazania czułości każdego doświadczenia i umożliwienia oceny zmienności przy przeprowadzaniu testu z upływem czasu. W etanolu należy przygotować osiem roztworów substancji słabo wiążącej o stężeniach w dołkach testowych w zakresie od 3 nM do 30 μM (-8,5[logM] do -4,5[logM]), w następujących odstępach: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

Substancja inna niż substancja wiążąca

30. Oktylotrietoksysilan (OTES, CAS 2 943-75-1) powinien być stosowany jako kontrola ujemna (substancja inna niż substancja wiążąca). Daje to pewność, że test w takiej formie umożliwi wykrycie, że badane substancje chemiczne nie wiążą się z hrERα. W etanolu należy przygotować osiem roztworów substancji innej niż substancja wiążąca o stężeniach w dołkach testowych w zakresie 0,1 nM–1 000 μM (-10[logM] do -3[logM]) w skali logarytmicznej. Ftalan dibutylu (DBP) można stosować jako alternatywną kontrolną substancję inną niż substancja wiążąca. Wykazano, że jego maksymalna rozpuszczalność wynosi -4[logM].

Stężenie hrERα

31. Należy stosować ilość receptora, które daje specyficzne wiązanie 20±5 % 1 nM radioligandu (zob. pkt 12–13 w dodatku 2). Roztwór hrERα należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

[^{3}H]-17β-estradiol

32. Stężenie [^{3}H]-17β-estradiolu w dołkach testowych powinno wynosić 1,0 nM.

▼M8

Badane substancje chemiczne

33. W pierwszej kolejności konieczne jest przeprowadzenie badania rozpuszczalności, aby ustalić granicę rozpuszczalności każdej badanej substancji chemicznej oraz określić właściwy zakres stężeń, który zostanie zastosowany przy realizacji protokołu badania. Granicę rozpuszczalności każdej badanej substancji chemicznej należy początkowo oznaczyć w rozpuszczalniku, a następnie potwierdzić w warunkach testowych. Końcowe stężenie badane w teście nie powinno przekraczać 1 mM. Badanie ustalające zakres dawkowania obejmuje kontrolę z rozpuszczalnikiem wraz z 8 seriami stężeń wzrastających w postępie logarytmicznym, począwszy od maksymalnego dopuszczalnego stężenia (np. 1 mM lub niższego, na podstawie granicy rozpuszczalności) oraz odnotowaną obecność zmętnienia lub osadu (zob. również pkt 35). Badaną substancję chemiczną należy badać przy użyciu 8 krzywych stężeń logarytmicznych, jak określono w poprzednim badaniu zakresu dawkowania. Stężenia w drugim i trzecim doświadczeniu należy odpowiednio dostosować, aby lepiej scharakteryzować krzywą zależności stężenie-odpowiedź.

34. Rozcieńczenia badanych substancji chemicznych należy przygotować w odpowiednim rozpuszczalniku (zob. pkt 26 dodatku 2). Jeżeli najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej nie jest rozpuszczalne ani w etanolu, ani w sulfotlenku dimetylowym, a dodanie większej ilości rozpuszczalnika spowodowałoby, że stężenie rozpuszczalnika w końcowej probówce byłoby wyższe niż dopuszczalna wartość graniczna, najwyższe stężenie można obniżyć do następnego niższego stężenia. W takim przypadku można dodać dodatkowe stężenie na dolnym końcu serii stężeń. Pozostałe stężenia w serii powinny pozostać niezmienione.

35. Roztwory badanej substancji chemicznej powinny być ściśle monitorowane po dodaniu ich do dołka testowego, ponieważ badana substancja chemiczna może wytrącać się po dodaniu do dołka testowego. Dane dotyczące wszystkich dołków, które zawierają osady, należy wyłączyć z dopasowywania krzywej, a także odnotować powód wyłączenia tych danych.

36. Jeżeli istnieją wcześniejsze informacje z innych źródeł, które dostarczają logarytm (IC_{50}) badanej substancji chemicznej, właściwe może być geometryczne oddzielenie rozcieńczeń (tj. 0,5 jednostki logarytmicznej wokół oczekiwanego logarytmu (IC_{50})). Wynik końcowy powinien odzwierciedlać wystarczającą rozpiętość stężeń po obu stronach logarytmu (IC_{50}), włączając „najwyższą wartość” i „najniższa wartość”, tak aby krzywą wiązania można było odpowiednio scharakteryzować.

Organizacja płytki testowej

37. Oznakowane mikropłytki powinny być przygotowane z uwzględnieniem sześciokrotnej inkubacji z kodami kontroli z rozpuszczalnikiem, najwyższego stężenia estrogenu odniesienia, który służy również jako wskaźnik wiązania nieswoistego (NSB), oraz kontroli z buforem, a także biorąc pod uwagę potrójne inkubacje z kodami dla każdego z ośmiu stężeń kontroli bez wiązań (oktylotrietoksysilan), siedem niższych stężeń estrogenu odniesienia, osiem poziomów dawek stężeń substancji słabo wiążącej oraz osiem stężeń każdej badanej substancji chemicznej (TC). Przykładowy wykres rozkładu płytki dla pełnych krzywych stężeń dla estrogenu odniesienia i kontroli podano w tabeli 4 poniżej. Dodatkowe mikropłytki wykorzystuje się dla badanych substancji chemicznych i powinny one zawierać kontrole płytek, tj. 1) wysokie (maksymalne przemieszczenie) i średnie (około IC_{50}) stężenie każdego z E2 oraz substancji słabo wiążącej w trzech powtórzeniach; 2) kontrolę z rozpuszczalnikiem i wiązanie nieswoiste, każde w sześciu powtórzeniach (tabela 5). Przykład arkusza roboczego rozkładu mikropłytki testowej, wykorzystującego trzy nieznane badane substancje chemiczne, znajduje się w dodatku 2.3. Stężenia wskazane w tabelach 4 i 5 są stężeniami końcowymi testu. Maksymalne stężenie dla E2 powinno wynosić 1×10^{-7} M, a dla substancji słabo wiążącej należy stosować

▼M8

najwyższe stężenie dla substancji słabo wiążącej na płytce 1. Stężenie IC_{50} musi być określone przez laboratorium na podstawie jego bazy danych historycznych dotyczących kontroli. Oczekuje się, że wartość ta będzie podobna do wartości zaobserwowanej w badaniach walidacyjnych (zob. tabela 1).

Tabela 4

Rozkład na mikropłytce testowej wiązania konkurencyjnego, pełne krzywe stężeń dla estrogenu odniesienia i próby kontrolne (płytka 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (tylko rozpuszczalnik)			TB (tylko rozpuszczalnik)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1\times10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1\times10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Próba ślepa (*)		
D	NE ($1\times10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1\times10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1\times10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1\times10^{-7,5}$)			NE ($1\times10^{-8,5}$)		
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	Próba ślepa (dla gorących) (**)			Próba ślepa (dla gorących) (**)			Kontrola z buforem			Kontrola z buforem		

W tym przykładzie substancją słabo wiążącą jest noretynodrel (NE)
(*) prawdziwa próba ślepa, bez wykorzystania dołka;
(**) próba ślepa niestosowana podczas inkubacji, ale stosowana w celu potwierdzenia całkowitej dodanej radioaktywności.

Tabela 5

Rozkład na mikropłytce testowej wiązania konkurencyjnego, pełne krzywe stężeń dla badanych substancji chemicznych i kontrole na płytce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (tylko rozpuszczalnik)			TB (tylko rozpuszczalnik)			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 ($1\times10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

W tym przykładzie substancją słabo wiążącą jest noretynodrel (NE)

▼M8

Zakończenie testu wiązania konkurencyjnego

38. Jak pokazano w tabeli 6, do dołków należy dodać 80 µl kontroli z rozpuszczalnikiem, kontroli z buforem, estrogenu odniesienia, substancji słabo wiążącej, substancji innej niż substancja wiążąca i badanych substancji chemicznych przygotowanych w buforze testowym. Następnie do każdego dołka należy dodać 40 µl roztworu 4 nM [^{3}H]-17β-estradiolu. Po łagodnej rotacji przez 10–15 minut w temperaturze od 2–8 °C należy dodać 40 µl roztworu hrERα. Mikropłytki testowe należy inkubować w temperaturze 2–8 °C przez 16–20 godzin i umieścić na rotatorze podczas okresu inkubacji.

Tabela 6

Objętość elementów testu w odniesieniu do testu wiązania konkurencyjnego hrER, mikropłytki

Objętość (µl)	Składnik
80	Nieoznakowany 17β-estradiol, noretynodrel, OTES, badane substancje chemiczne, rozpuszczalnik lub bufor
40	Roztwór 4 nM [^{3}H]-17β-estradiolu
40	Roztwór hrERα, stężenie takie, jak określono
160	***Całkowita objętość w każdym dołku testowym***

39. Oznaczenie ilościowe [^{3}H]-17β-estradiolu związanego z hrERα po oddzieleniu [^{3}H]-17β-estradiolu związanego z hrERα od wolnego [^{3}H]-17β-estradiolu poprzez dodanie 80 µl zimnej zawiesiny DCC do każdego dołka należy następnie przeprowadzić jak opisano w pkt 20–23 w odniesieniu do testu wiązania nasycenia.

40. Dołki H1-6 (oznaczone w tabeli 4 jako próby ślepe (dla gorących)) reprezentują DPM estradiolu oznakowanego [^{3}H] w 40 µl. Podwielokrotność 40 µl należy wprowadzić bezpośrednio do płynu scyntylacyjnego w dołkach H1–H6.

Kryteria dopuszczalności

Test wiązania nasycenia

41. Krzywa wiązania specyficznego powinna osiągnąć stan równowagi, ponieważ zastosowano zwiększające się stężenia [^{3}H]-17β-estradiolu, wskazujące na nasycenie hrERα ligandem.

42. Wiązanie specyficzne przy 1 nM [^{3}H]-17β-estradiolu powinno mieścić się w dopuszczalnym zakresie od 15 % do 25 % średniej zmierzonej całkowitej radioaktywności dodanej we wszystkich seriach badawczych. Sporadyczne niewielkie odchylenia poza ten zakres są dopuszczalne, ale jeśli wyniki serii badawczych systematycznie nie mieszczą się w tym zakresie lub wynik danej serii badawczej wychodzi znacznie poza ten zakres, należy dostosować stężenie białka i powtórzyć test nasycenia.

43. Dane powinny tworzyć liniowy wykres Scatcharda.

44. Wiązania nieswoiste nie powinny być nadmierne. Wartość dla wiązań nieswoistych powinna zazwyczaj wynosić < 35 % wiązań całkowitych. Stosunek ten może jednak sporadycznie przekraczać tę granicę przy pomiarze bardzo niskich DPM dla najniższego stężenia badanego 17β-estradiolu znakowanego izotopem.

▼**M8**

Test wiązania konkurencyjnego

45. Zwiększające się stężenia nieoznakowanego 17β-estradiolu powinny wyprzeć [^{3}H]-17β-estradiol z receptora w sposób zgodny z jednoobszarowym wiązaniem konkurencyjnym.

46. Wartość IC_{50} dla estrogenu odniesienia (tj. 17β-estradiolu) powinna być w przybliżeniu równa stężeniu molowemu [^{3}H]-17β-estradiolu powiększonemu o Kd oznaczony w teście wiązania nasycenia.

47. Całkowite wiązanie specyficzne powinno być spójne w dopuszczalnym zakresie 20 ± 5 %, gdy średnie zmierzone stężenie całkowitej radioaktywności dodanej do każdego dołka wynosi 1 nM we wszystkich seriach badawczych. Sporadyczne niewielkie odchylenia poza ten zakres są dopuszczalne, ale jeśli wyniki serii badawczych systematycznie nie mieszczą się w tym zakresie lub wynik danej serii badawczej wychodzi znacznie poza ten zakres, należy dostosować stężenie białka.

48. Rozpuszczalnik nie powinien powodować zmiany czułości ani odtwarzalności testu. Wyniki kontroli z rozpuszczalnikiem (dołki z wiązaniem całkowitym) porównuje się z wynikami kontroli z buforem w celu sprawdzenia, czy zastosowany rozpuszczalnik nie ma wpływu na system testu. Wyniki kontroli wiązania całkowitego i kontroli z buforem powinny być porównywalne, jeżeli rozpuszczalnik nie wpływa na test.

49. Substancja inna niż substancja wiążąca nie powinna wypierać więcej niż 25 % [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα podczas badania do 10^{-3} M (OTES) lub 10^{-4} M (DBP).

50. Opracowano kryteria efektywności dla estrogenu odniesienia i dwóch substancji słabo wiążących (np. noretynodrel, noretyndron) z wykorzystaniem danych z badania walidacyjnego testu wiązania hrER Freybergera–Wilsona (załącznik N do 2 pozycji bibliografii). 95 % przedziały ufności podano w odniesieniu do średniej (n) +/- SD dla wszystkich serii badawczych kontroli wykonanych w laboratoriach uczestniczących w badaniu walidacyjnym. 95 % przedziały ufności obliczono dla parametrów dopasowania krzywej (tj. najwyższa wartość, najniższa wartość, krzywa Hilla, logarytm IC_{50}) dla estrogenu odniesienia i substancji słabo wiążących oraz dla $\log_{10}$RBA substancji słabo wiążących w stosunku do estrogenu odniesienia i są one dostarczane jako kryteria efektywności dla kontroli dodatnich. W tabeli 1 przedstawiono oczekiwane zakresy parametrów dopasowania krzywej, które mogą być wykorzystane jako kryteria efektywności. W praktyce zakres IC_{50} może się nieznacznie różnić w zależności od Kd preparatu receptora i stężenia ligandu.

51. Nie opracowano kryteriów efektywności w odniesieniu do parametrów dopasowania krzywej dla badanych substancji chemicznych ze względu na szeroki wachlarz istniejących potencjalnych badanych substancji chemicznych i zmienność potencjalnych powinowactw i wyników (np. pełna krzywa, krzywa częściowa, brak dopasowania krzywej). Dokonując przeglądu wyników z każdej serii badawczej badanej substancji chemicznej, należy jednak przyjąć profesjonalny osąd. Należy zastosować wystarczający zakres stężeń badanej substancji chemicznej, aby wyraźnie określić najwyższą wartość (np. 90–100 % wiązania) konkurencyjnej krzywej. Zmienność wśród kontrprób przy każdym stężeniu badanej substancji chemicznej, jak również wśród 3 niejednoczesnych serii badawczych powinna być uzasadniona i poparta naukowo. Kontrole z każdej serii badawczej badanej substancji chemicznej powinny zbliżać się do miar efektywności zgłoszonych dla tego testu Freybergera–Wilsona i powinny być spójne z danymi historycznymi dotyczącymi kontroli z każdego odpowiedniego laboratorium.

▼M8

ANALIZA DANYCH

Test wiązania nasycenia

52. Dokonuje się pomiaru zarówno wiązania całkowitego, jak i nieswoistego. W przypadku tych wartości wiązanie swoiste wzrastających stężeń [^{3}H]-17β-estradiolu w warunkach równowagi jest obliczane przez odjęcie wiązania nieswoistego od całkowitego. Wykres stężenia wiązań specyficznych w porównaniu ze stężeniem [^{3}H]-17β-estradiolu powinien osiągnąć plateau dla maksymalnego wiązania specyficznego wskazującego na nasycenie hrERα [^{3}H]-17β-estradiolem. Ponadto analiza danych powinna dokumentować wiązanie estradiolu [^{3}H]-17β-estradiolu z pojedynczym obszarem wiązania o wysokim powinowactwie. Wiązanie nieswoiste, całkowite i swoiste powinno być prezentowane na krzywej wiązania nasycenia. W dalszej analizie tych danych należy wykorzystać analizę regresji nieliniowej (np. BioSoft; McPherson 1985; Motulsky 1995) z końcowym prezentowaniem danych w formie wykresu Scatcharda.

53. W analizie danych należy określić Bmax i Kd wyłącznie na podstawie danych dotyczących wiązania całkowitego, przy założeniu, że wiązanie niespecyficzne jest liniowe, chyba że podano uzasadnienie dla zastosowania innej metody. Ponadto przy określaniu najlepszego dopasowania należy stosować regresję odpornościową, chyba że zostanie podane uzasadnienie. Należy podać metodę wybraną dla regresji odpornościowej. Korektę obniżenia stężenia ligandu (np. przy użyciu metody na podstawie Swillens 1995) należy zawsze stosować przy określaniu Bmax i Kd na podstawie danych dotyczących wiązania nasycenia.

Test wiązania konkurencyjnego

54. Krzywa wiązania konkurencyjnego jest wykreślona jako krzywa wiązania specyficznego [^{3}H]-17β-estradiolu w stosunku do stężenia (log10 jednostek) konkurenta. Stężenie badanej substancji chemicznej, która hamuje 50 % maksymalnego wiązania specyficznego [^{3}H]-17β-estradiolu, jest wartością IC_{50}.

55. Szacunki wartości logarytmu (IC_{50}) dla kontroli dodatnich (np. estrogen odniesienia i substancja słabo wiążąca) należy określić, wykorzystując właściwe oprogramowanie dopasowane do krzywej nieliniowej, aby pasowały do równania Hilla o czterech parametrach (np. BioSoft; McPherson 1985; Motulsky 1995). Najwyższą wartość, najniższą wartość, krzywą Hilla i logarytm IC_{50} należy zasadniczo pozostawić bez ograniczeń przy dopasowywaniu tych krzywych. Regresję odpornościową należy stosować przy określaniu najlepszego dopasowania, chyba że podane zostanie uzasadnienie. Nie należy stosować korekty obniżenia stężenia ligandu. Po przeprowadzeniu analizy wstępnej każda krzywa wiązania powinna zostać poddana przeglądowi w celu zapewnienia odpowiedniego dopasowania do modelu. Względne powinowactwo wiązania (RBA) w odniesieniu do substancji słabo wiążącej należy obliczać jako procent logarytmu (IC_{50}) dla substancji słabo wiążącej względem logarytmu (IC_{50}) dla 17β-estradiolu. Wyniki kontroli dodatnich i kontroli substancji innych niż substancja wiążąca powinny być oceniane przy użyciu pomiarów efektywności testu określonych w pkt 45–50 niniejszego dodatku 2.

56. Dane dotyczące wszystkich badanych substancji chemicznych należy analizować na zasadzie stopniowego podejścia, aby zapewnić odpowiednią analizę danych i właściwą klasyfikację każdej krzywej wiązania konkurencyjnego. Zaleca się, aby każda seria badawcza w odniesieniu do badanej substancji chemicznej została wstępnie poddana znormalizowanej analizie danych, która jest identyczna z analizą stosowaną w przypadku kontroli estrogenu odniesienia i substancji słabo wiążącej (zob. pkt 55 powyżej). Po zakończeniu należy przeprowadzić przegląd techniczny parametrów dopasowania krzywej, jak również wizualny przegląd stopnia, w jakim dane pasują do wygenerowanej krzywej wiązania konkurencyjnego dla każdej serii badawczej. W trakcie tego przeglądu technicznego obserwacje zależnego od stężenia spadku w procentach związanego specyficznie [^{3}H]-17β-estradiolu, małej zmienności pomiędzy kontrpróbami technicznymi przy każdym stężeniu chemicznym oraz spójności parametrów dopasowania pomiędzy trzema seriami badawczymi stanowią dobrą wskazówkę, że test i analizy danych zostały wykonane prawidłowo.

▼M8

Interpretacja danych

57. O ile spełnione są wszystkie kryteria dopuszczalności, badaną substancję chemiczną uważa się za substancję wiążącą w odniesieniu do hrERα, jeżeli krzywa wiązania może być dopasowana, a najniższy punkt na krzywej reakcji w zakresie danych wynosi mniej niż 50 % (rysunek 1).

58. O ile spełnione są wszystkie kryteria dopuszczalności, badaną substancję chemiczną uważa się za substancję inną niż substancja wiążąca w odniesieniu do hrERα, jeśli:

— krzywa wiązania może być dopasowana, a najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji w zakresie danych wynosi powyżej 75 %, lub

— krzywa wiązania nie może być dopasowana, a najniższy niewygładzony średni procent wiązania wśród grup stężeń w danych wynosi powyżej 75 %.

59. Badane substancje chemiczne uważa się za niejednoznaczne, jeśli zostanie spełniony żaden z powyższych warunków (np. najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji mieści się pomiędzy 76 a 51 %).

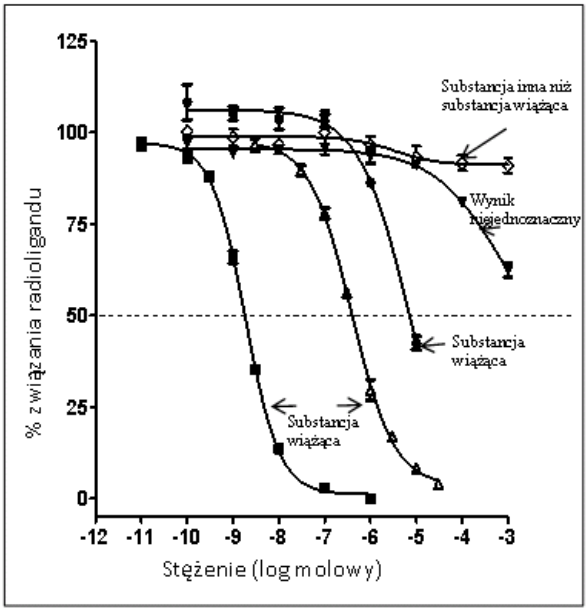
Tabela 7

Kryteria przypisywania klasyfikacji na podstawie krzywej wiązania konkurencyjnego w odniesieniu do badanej substancji chemicznej

Klasyfikacja	Kryteria
Substancja wiążąca[a]	Krzywa wiązania może być dopasowana. **Najniższy punkt na krzywej reakcji w zakresie danych wynosi mniej niż 50 %**.
Substancja inna niż substancja wiążąca[b]	Jeżeli krzywa wiązania może być dopasowana, **najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji w zakresie danych wynosi powyżej 75 %**. Jeżeli krzywa wiązania nie może być dopasowana, **najniższy niewygładzony średni odsetek wiązania wśród grup stężeń w danych wynosi powyżej 75 %**.
Wynik niejednoznaczny[c]	Każda sprawdzalna seria badawcza, która nie dotyczy substancji wiążącej, ani substancji innej niż substancja wiążąca (np. najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji mieści się w granicach 76–51 %).

Rysunek 1

Przykłady klasyfikacji badanej substancji chemicznej z wykorzystaniem krzywej wiązania konkurencyjnego



▼M8

60. Wielokrotne serie badawcze prowadzone w laboratorium w przypadku badanej substancji chemicznej są łączone poprzez przypisanie wartości liczbowych do każdej serii badawczej i uśrednienie wszystkich serii, jak pokazano w tabeli 8. Wyniki połączonych serii badawczych w każdym laboratorium są porównywane z oczekiwaną klasyfikacją każdej badanej substancji chemicznej.

Tabela 8

Metoda klasyfikacji badanej substancji chemicznej z wykorzystaniem wielu serii badawczych w laboratorium

Przypisanie wartości do każdej serii badawczej:	
Klasyfikacja	**Wartość liczbowa**
Substancja wiążąca	2
Wynik niejednoznaczny	1
Substancja inna niż substancja wiążąca	0
Klasyfikacja średniej wartości liczbowej w poszczególnych seriach badawczych:	
Klasyfikacja	**Wartość liczbowa**
Substancja wiążąca	Średnia $\geq$ 1,5
Wynik niejednoznaczny	0,5 $\leq$ Średnia $<$ 1,5
Substancja inna niż substancja wiążąca	Średnia $<$ 0,5

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

61. Zob. pkt 24 „**ELEMENTÓW TESTU WIĄZANIA hrER**” w niniejszej metodzie badawczej.

▼**M8**

Dodatek 2.1

WYKAZ POJĘĆ

[^{3}H]E2: 17β-estradiol znakowany izotopem z trytem

DCC: Węgiel drzewny pokryty dekstranem

E_2: Nieoznakowany 17β-estradiol (obojętny)

Bufor testowy: 10 mM Tris, 10 mg albuminy surowicy bydlęcej /ml, 2 mM DTT, 10 % glicerol, 0,2 mM leupeptyny, pH 7,5

hrERα: ludzki rekombinowany receptor estrogenowy alfa

Kontrpróba: Jeden z wielu dołków, które mają tę samą zawartość z tym samym stężeniem i są poddawane testowi jednocześnie w ramach jednej serii badawczej. W niniejszym protokole każde stężenie badanej substancji chemicznej jest badane w trzech powtórzeniach; oznacza to, że istnieją trzy kontrpróby, które są testowane jednocześnie przy każdym stężeniu badanej substancji chemicznej.

Seria badawcza: Pełen zestaw poddawanych jednocześnie serii badawczej dołków mikropłytki, który dostarcza wszelkich informacji niezbędnych do scharakteryzowania wiązania badanej substancji chemicznej z hrERα (tj. całkowity [^{3}H]-17β-estradiol dodany do dołka testowego, maksymalne wiązanie [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα, wiązanie niespecyficzne, oraz wiązanie całkowite przy różnych stężeniach badanej substancji chemicznej). W serii badawczej można wykorzystać tylko jeden dołek (tj. kontrpróbę) na każde stężenie, ale ponieważ niniejszy protokół wymaga trzykrotnego przeprowadzania testu, w jednej analizie wykorzystuje się trzy dołki na każde stężenie. Niniejszy protokół wymaga ponadto przeprowadzenia trzech niezależnych (tj. nierównoczesnych) serii badawczych w odniesieniu do każdej substancji chemicznej.

▼**M8**

Dodatek 2.2

TYPOWY TEST NASYCENIA [^{3}H]-17B-ESTRADIOLU Z TRZEMA DOŁKAMI STANOWIĄCYMI KONTRPRÓBĘ

Typowy test nasycenia [^{3}H]-17β-estradiolu z trzema dołkami stanowiącymi kontrpróbę

Pozycja	Kontrpróba	Kod rodzaju dołka	Stężenie początkowe gorącego E2 (nM)	Objętość gorącego E2 (µl)	Stężenie końcowe gorącego E2 (nM)	Stężenie początkowe zimnego E2 (µM)	Objętość zimnego E2 (µl)	Stężenie końcowe zimnego E2 (µM)	Objętość buforu (µl)	Objętość receptora (µl)	Całkowita objętość w dołkach
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

Typowy test nasycenia [^{3}H]-17β-estradiolu z trzema dołkami stanowiącymi kontrpróbę

Pozycja	Kontrpróba	Kod rodzaju dołka	Stężenie początkowe gorącego E2 (nM)	Objętość gorącego E2 (µl)	Stężenie końcowe gorącego E2 (nM)	Stężenie początkowe zimnego E2 (µM)	Objętość zimnego E2 (µl)	Stężenie końcowe zimnego E2 (µM)	Objętość buforu (µl)	Objętość receptora (µl)	Całkowita objętość w dołkach
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**

Typowy test nasycenia [^{3}H]-17β-estradiolu z trzema dołkami stanowiącymi kontrpróbę

Pozycja	Kontrpróba	Kod rodzaju dołka	Stężenie początkowe gorącego E2 (nM)	Objętość gorącego E2 (µl)	Stężenie końcowe gorącego E2 (nM)	Stężenie początkowe zimnego E2 (µM)	Objętość zimnego E2 (µl)	Stężenie końcowe zimnego E2 (µM)	Objętość buforu (µl)	Objętość receptora (µl)	Całkowita objętość w dołkach
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	Gorąca	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Gorąca	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Gorąca	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Gorąca	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Gorąca	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Gorąca	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Gorąca	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Gorąca	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Gorąca	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Gorąca	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Gorąca	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Gorąca	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼M8

Typowy test nasycenia [^{3}H]-17β-estradiolu z trzema dołkami stanowiącymi kontrpróbę

Pozycja	Kontrpróba	Kod rodzaju dołka	Stężenie początkowe gorącego E2 (nM)	Objętość gorącego E2 (µl)	Stężenie końcowe gorącego E2 (nM)	Stężenie początkowe zimnego E2 (µM)	Objętość zimnego E2 (µl)	Stężenie końcowe zimnego E2 (µM)	Objętość buforu (µl)	Objętość receptora (µl)	Całkowita objętość w dołkach
H1	1	Gorąca	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Gorąca	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Gorąca	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Gorąca	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Gorąca	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Gorąca	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Gorąca	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Gorąca	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Gorąca	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Gorąca	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Gorąca	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Gorąca	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Należy pamiętać, że „gorące” dołki są puste podczas inkubacji. 40 µl dodaje się tylko w celu zliczania scyntylacji.

▼**M8**

Dodatek 2.3

ROZKŁAD DOŁKÓW W TEŚCIE WIĄZANIA KONKURENCYJNEGO

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
S	A1	1	wiązanie całkowite	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	wiązanie całkowite	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	wiązanie całkowite	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	wiązanie całkowite	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	wiązanie całkowite	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	wiązanie całkowite	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	zimne E2 (wysokie)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	zimne E2 (wysokie)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	zimne E2 (wysokie)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	zimne E2 (wysokie)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	zimne E2 (wysokie)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	zimne E2 (wysokie)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	zimne E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	zimne E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	zimne E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	zimne E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
S	B5	2	zimne E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	zimne E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	zimne E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	zimne E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	zimne E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	zimne E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	zimne E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	zimne E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	zimne E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	zimne E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	zimne E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	zimne E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	zimne E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	zimne E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	zimne E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	zimne E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11

▼**M8**

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
S	C9	3	zimne E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	ślepa próba	ślepa próba	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	ślepa próba	ślepa próba	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	ślepa próba	ślepa próba	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	noretynodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretynodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretynodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretynodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretynodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretynodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretynodrel	NE	WP	6.00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08

▼**M8**

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
S	E8	2	noretynodrel	NE	WP	6.00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretynodrel	NE	WP	6.00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretynodrel	NE	WP	6.00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	noretynodrel	NE	WP	6.00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretynodrel	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**

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe 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	gorąca	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	gorąca	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	gorąca	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	gorąca	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	gorąca	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	gorąca	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	kontrola z buforem	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	kontrola z buforem	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	kontrola z buforem	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	kontrola z buforem	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	kontrola z buforem	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	kontrola z buforem	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Należy pamiętać, że „gorące” dołki są puste podczas inkubacji. 40 µl dodaje się tylko w celu zliczania scyntylacji.

▼M8

Rozkład dołków w teście wiązania konkurencyjnego

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µL)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki rozcieńczenia (µL)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
P1	A1	1	wiązanie całkowite	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	wiązanie całkowite	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	wiązanie całkowite	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	wiązanie całkowite	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	wiązanie całkowite	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	wiązanie całkowite	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	zimne E2 (wysokie)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	zimne E2 (wysokie)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	zimne E2 (wysokie)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	zimne E2 (wysokie)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	zimne E2 (wysokie)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	zimne E2 (wysokie)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Rozkład dołków w teście wiązania konkurencyjnego

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µL)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki rozcieńczenia (µL)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
P1	C1	1	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Badana substancja chemiczna nr 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Rozkład dołków w teście wiązania konkurencyjnego

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µL)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki rozcieńczenia (µL)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
P1	E1	1	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Badana substancja chemiczna nr 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Rozkład dołków w teście wiązania konkurencyjnego

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µL)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki rozcieńczenia (µL)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
P1	G1	1	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Badana substancja chemiczna nr 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretynodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretynodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretynodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretynodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretynodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretynodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	zimne E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	zimne E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	zimne E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	zimne E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	zimne E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	zimne E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

▼**M8**

Dodatek 3

TEST *IN VITRO* WIĄZANIA RECEPTORA ESTROGENOWEGO INSTYTUTU OCENY CHEMICZNEJ I BADAŃ (ANG. CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE, CERI) WYKORZYSTUJĄCY BIAŁKO DOMENY WIĄŻĄCEJ LIGAND LUDZKIEGO REKOMBINOWANEGO RECEPTORA ESTROGENOWEGO ALFA (2).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)

1. Niniejszy test *in vitro* nasycenia receptora estrogenowego (ERα) i wiązania konkurencyjnego wykorzystuje domenę wiążącą ligand (LBD) ludzkiego receptora estrogenowego alfa (hrERα). Ten konstrukt białkowy został wyprodukowany przez Instytutu Oceny Chemicznej i Badań (CERI) w Japonii i istnieje jako białko fuzyjne S-transferazy glutationowej (GST) i jest wyrażony w komórkach *E. coli.* Protokół CERI został poddany międzynarodowemu wielolaboratoryjnemu badaniu walidacyjnemu (2), które wykazało jego adekwatność i wiarygodność w odniesieniu do zaplanowanego celu testu.

2. Test ten jest procedurą klasyfikacyjną służącą do identyfikacji substancji, które mogą wiązać się z hrERα. Służy on do określenia zdolności badanej substancji chemicznej do konkurowania z 17β-estradiolem w zakresie wiązania z hrERα-LBD. Ilościowe wyniki testu mogą obejmować IC_{50} (miara stężenia badanej substancji chemicznej potrzebnego do wyparcia połowy [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα) i względne powinowactwa wiązania badanych substancji chemicznych w odniesieniu do hrERα w porównaniu z 17β-estradiolem. Do celów klasyfikacji substancji chemicznych akceptowalne wyniki testów jakościowych mogą obejmować klasyfikację badanych substancji chemicznych jako substancji wiążących hrERα, substancji innych niż substancja wiążąca lub niejednoznacznych w oparciu o kryteria opisane dla krzywych wiązania.

3. W teście wykorzystuje się ligand promieniotwórczy, który wymaga zezwolenia na stosowanie materiałów promieniotwórczych przez laboratorium. Wszystkie procedury dotyczące radioizotopów i niebezpiecznych substancji chemicznych powinny być zgodne z przepisami i procedurami opisanymi w prawodawstwie krajowym.

4. Przed rozpoczęciem stosowania tego badania do celów regulacyjnych należy zapoznać się z sekcjami „**WPROWADZENIE OGÓLNE**” oraz „**ELEMENTY TESTU WIĄZANIA hrER**”. Definicje i skróty stosowane w niniejszej wytycznej dotyczącej badań opisano w dodatku 1.

ZASADY WYKONANIA TESTU (ZOB. RÓWNIEŻ WPROWADZENIE OGÓLNE)

5. W teście wiązania hrERα mierzy się zdolność znakowanego izotopem liganda ([^{3}H]17β-estradiolu) do wiązania się z receptorem estrogenowym w obecności zwiększających się stężeń badanej substancji chemicznej (tj. konkurenta). Badane substancje chemiczne o wysokim powinowactwie z receptorem estrogenowym konkurują ze znakowanym izotopem ligandem w niższym stężeniu w porównaniu z substancjami chemicznymi o niższym powinowactwie z receptorem.

6. Niniejszy test składa się z dwóch głównych elementów: doświadczenie dotyczące wiązania nasycenia mające na celu scharakteryzowanie parametrów interakcji receptor-ligand, po którym następuje doświadczenie dotyczące wiązania konkurencyjnego, charakteryzujący konkurencję pomiędzy badaną substancją chemiczną a znakowanym izotopem ligandem w zakresie wiązania z receptorem estrogenowym.

▼M8

7. Celem doświadczenia dotyczącego wiązania nasycenia jest scharakteryzowanie konkretnej partii receptorów pod kątem powinowactwa wiązania i ich liczby w ramach przygotowania do doświadczenia dotyczącego wiązania konkurencyjnego. W doświadczeniu dotyczącym wiązania nasycenia mierzy się, w warunkach równowagi, powinowactwo stałego stężenia receptora estrogenowego w odniesieniu do jego naturalnego ligandu (reprezentowanego przez stałą dysocjacji, Kd) oraz stężenie obszarów czynnego receptora (Bmax).

8. W doświadczeniu dotyczącym konkurencyjnego wiązania mierzy się powinowactwo substancji do konkurowania z [^{3}H]17β-estradiolem o wiązanie z receptorem estrogenowym. Powinowactwo jest określa się ilościowo za pomocą stężenia badanej substancji chemicznej, która w stanie równowagi hamuje 50 % specyficznego wiązania [^{3}H]17β-estradiolu (nazywanego „stężeniem hamującym 50 %" lub IC_{50}). Można je również ocenić za pomocą względnego powinowactwa wiązania (RBA, w stosunku do IC_{50} estradiolu mierzonego oddzielnie w tej samej serii badawczej). W doświadczeniu dotyczącym konkurencyjnego wiązania mierzy się wiązanie [^{3}H]17β-estradiolu przy stałym stężeniu w obecności szerokiego zakresu (ośmiu rzędów wielkości) stężeń badanych substancji chemicznych. Dane są następnie dopasowywane, na ile to możliwe, do postaci równania Hilla (Hill 1910), które opisuje przemieszczenie radioligandu przez jednoobszarową konkurencyjną substancję wiążącą. Zakres przemieszczenia estradiolu znakowanego izotopem w stanie równowagi jest wykorzystywany do scharakteryzowania badanej substancji chemicznej jako substancji wiążącej, substancji innej niż substancja wiążąca lub generującej reakcję niejednoznaczną.

PROCEDURA

Wykazanie dopuszczalnej efektywności białka hrERα

9. Przed rutynowym wykonaniem testów nasycenia i wiązania konkurencyjnego należy wykazać, że efektywność każdej nowej partii hrERα w laboratorium, w którym będzie używana, jest prawidłowa. W celu zademonstrowania efektywności należy zastosować dwuetapowy proces. Etapy te są następujące:

— Przeprowadzenie testu wiązania nasycenia [^{3}H]-17β-estradiolu w celu wykazania swoistości i nasycenia hrERα. Analiza regresji nieliniowej tych danych (np. BioSoft; McPherson 1985; Motulsky 1995), a następnie wykres Scatcharda powinien dokumentować powinowactwo wiązania hrERα [^{3}H]-17β-estradiolu (Kd) i liczbę receptorów (Bmax) w odniesieniu do konkretnej partii hrERα.

— Wykonanie testu wiązania konkurencyjnego przy użyciu substancji kontrolnych (estrogen odniesienia (17β-estradiol), substancji słabo wiążącej (np. noretynodrel lub noretyndron) oraz substancji innej niż substancja wiążąca (oktylotrietoksysilan, OTES). Każde laboratorium powinno stworzyć bazę danych historycznych w celu udokumentowania spójności IC50 i wartości istotnych dla estrogenów odniesienia i substancji słabo wiążących między doświadczeniami i różnymi partiami hrERα. Ponadto parametry krzywych konkurencyjnego wiązania substancji kontrolnych powinny mieścić się w przedziale ufności 95 % (zob. tabela 1), który opracowano wykorzystując dane laboratoriów uczestniczących w badaniu walidacyjnym w odniesieniu do celów niniejszego testu (2).

Tabela 1

Kryteria efektywności opracowane dla estrogenów odniesienia i substancji słabo wiążących, test wiązania hrER CERI

Substancja	Parametr	Wartość średnia [a]	Odchylenie standardowe (n)	Przedziały ufności [b] 95 %	
				Dolna wartość graniczna	Górna wartość graniczna
17β-estradiol	Najwyższa wartość	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Najniższa wartość	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼M8

Substancja	Parametr	Wartość średnia [a]	Odchylenie standardowe (n)	Przedziały ufności [b] 95 %	
				Dolna wartość graniczna	Górna wartość graniczna
	Krzywa Hilla	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	$LogIC_{50}$	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Noretynodrel	Najwyższa wartość	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Najniższa wartość	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Krzywa Hilla	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	$LogIC_{50}$	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Noretyndron [c]	Najwyższa wartość	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Najniższa wartość	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Krzywa Hilla	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	$LogIC_{50}$	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

[a] Średnie ± odchylenie standardowe (SD) (wielkość próby (n) obliczono przy użyciu szacunków parametrów dopasowania krzywej (4-parametrowe równanie Hilla)) w odniesieniu do serii badawczej kontroli wykonanych w czterech laboratoriach w ramach badania walidacyjnego (zob. załącznik N do 2. pozycji bibliografii).

[b] przedziały ufności 95 % podaje się jako wskazówkę do kryteriów dopuszczalności.

[c] Testowanie noretyndronu było opcjonalne w przypadku podzadania 4 przeprowadzonego podczas badania walidacyjnego (zob. 2. pozycja bibliografii, zob. podzadanie 4). W związku z tym średnią ± SD (n) obliczono przy użyciu szacunków dopasowania krzywej (4-parametrowe równanie Hilla) dla kontrolnych serii badawczych wykonanych w dwóch laboratoriach.
Zakres IC_{50} będzie zależał od Kd preparatu receptora i stężenia znakowanego izotopem ligandu używanego w każdym laboratorium. Dopuszczalna będzie odpowiednia korekta zakresu IC_{50} na podstawie warunków stosowanych do przeprowadzenia testu.

Wykazanie biegłości laboratorium

10. Zob. pkt 17 i 18 oraz tabela 2 w rozdziale „**ELEMENTY TESTU WIĄZANIA hrER**” w niniejszej metodzie badawczej. Każdy test (nasycenia i wiązania konkurencyjnego) powinien składać się z trzech niezależnych serii badawczych (tj. ze świeżymi rozcieńczeniami receptora, substancji chemicznych i odczynników) w różnych dniach, a każda seria badawcza powinna obejmować trzy kontrpróby.

Określanie stężenia receptora (hrERα)

11. Stężenie czynnego receptora różni się nieznacznie w zależności od partii i warunków składowania. Z tego powodu należy określić stężenie czynnego receptora otrzymanego od dostawcy. Pozwoli to uzyskać odpowiednie stężenie aktywnego receptora w serii badawczej.

12. W warunkach odpowiadających konkurencyjnym wiązaniom (tj. 0,5 nM [^{3}H]-estradiolu), nominalne stężenia 0,1, 0,2, 0,4 i 0,6 nM receptora powinny być inkubowane przy braku (wiązanie całkowite) i obecności (wiązanie nieswoiste) 1 μM nieoznakowanego estradiolu. Określone wiązanie, obliczone jako różnica wiązania całkowitego i nieswoistego,

▼M8

jest wykreślane w funkcji nominalnego stężenia receptora. Stężenie receptora, które daje określone wartości wiązania odpowiadające 40 % dodanego oznaczenia izotopem, jest związane z odpowiadającym mu stężeniem receptora, a to stężenie receptora należy wykorzystywać w doświadczeniach dotyczących nasycenia i konkurencyjnego wiązania. Często końcowe stężenie hrER wynoszące 0,2 nM jest zgodne z tym warunkiem.

13. Jeżeli kryterium 40 % nie może być wielokrotnie spełnione, należy sprawdzić, czy w zestawie doświadczenia nie ma potencjalnych błędów. Nieosiągnięcie kryterium 40 % może wskazywać, że w partii rekombinowanej jest bardzo mało aktywnego receptora, w związku z czym należy rozważyć zastosowanie innej partii receptora.

Test nasycenia

14. Osiem wzrastających stężeń [^{3}H]17β-estradiolu należy oceniać trzykrotnie, w następujących trzech warunkach (zob. tabela 2):

a. przy braku nieoznakowanego 17β-estradiolu i w obecności receptora estrogenowego. Jest to wyznaczenie wiązania całkowitego przez pomiar radioaktywności w dołkach, w których znajduje się tylko [^{3}H]17β-estradiol.

b. W obecności 2000-krotnego przekroczenia stężenia nieoznakowanego 17β-estradiolu nad oznakowanym 17β-estradiolem i w obecności receptora estrogenowego. Zamierzeniem tego warunku jest nasycenie aktywnych obszarów wiązania nieoznakowanym 17β-estradiolem, a w wyniku pomiaru radioaktywności w dołkach, określenie wiązania nieswoistego. Każdy pozostały gorący estradiol, który może wiązać się z receptorem uznaje się za wiążący w nieswoistym obszarze, ponieważ zimny estradiol powinien być w tak wysokim stężeniu, aby wiązał się ze wszystkimi dostępnymi swoistymi obszarami na receptorze.

c. Przy braku nieoznakowanego 17β-estradiolu i braku receptora estrogenowego (określenie całkowitej radioaktywności).

Przygotowanie roztworów [^{3}H]-17β-estradiolu, nieoznakowanego 17β-estradiolu i hrERα

15. Należy przygotować roztwór o stężeniu 40 nM [^{3}H]-17β-estradiolu z użyciem roztworu podstawowego 1 μM [^{3}H]-17β-estradiolu w sulfotlenku dimetylowym, w temperaturze pokojowej dodając sulfotlenek dimetylowy (aby przygotować roztwór 200 nM) oraz bufor testowy (aby przygotować roztwór 40 nM). Stosując ten roztwór 40 nM, należy w temperaturze pokojowej przygotować serię rozcieńczeń [^{3}H]-17β-estradiolu w zakresie od 0,313 nM do 40 nM i zawierającą roztwór buforowy (co przedstawia pozycja 12 tabeli 2). Dodając 10 μl tych roztworów do odpowiednich dołków płytki 96-dołkowej (w ostatecznej objętości 3 μl), uzyskuje się końcowe stężenia testowe w zakresie od 0,0313 μM do 4,0 μM (zob. tabele 2 i 3). Przygotowanie buforu testowego, obliczenie początkowego roztworu podstawowego [^{3}H]-17β-estradiolu w oparciu na jego właściwej aktywności, preparaty rozcieńczeń i określenie stężeń są szczegółowo opisane w protokole CERI (2).

16. Należy przygotować rozcieńczenia nieoznakowanych roztworów 17β-estradiolu z użyciem roztworu podstawowego 1 nM 17β-estradiolu dodając bufor testowy, aby uzyskać osiem stężeń wzrastających początkowo od 0,625 μM do 80 μM. Dodając 10 μl tych roztworów do odpowiednich dołków testowych płytki 96-dołkowej przeznaczonej do pomiaru wiązań nieswoistych, uzyskuje się końcowe stężenia testowe w zakresie od 0,0625 μM do 8 μM (zob. tabele 2 i 3). Przygotowanie rozcieńczeń nieoznakowanego 17β-estradiolu jest szczegółowo opisane w protokole CERI (2).

▼M8

17. Należy stosować nominalne stężenie receptora, które daje specyficzne wiązanie 40±10 % (zob. pkt 12–13). Roztwór hrERα należy przygotować w lodowatym buforze testowym bezpośrednio przed użyciem, tj. po przygotowaniu wszystkich dołków do wiązania całkowitego, wiązania nieswoistego oraz samodzielnego gorącego ligandu.

18. Płytki 96-dołkowe są przygotowywane w sposób przedstawiony w tabeli 2, z 3 kontrpróbami na stężenie [^{3}H]-17β-estradiolu. Objętość [^{3}H]-17β-estradiolu, nieoznakowanego 17β-estradiolu, buforu i receptora przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 2

Rozkład na mikropłytce do testu wiązania nasycenia

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Do pomiaru TB			Do pomiaru NSB			Do określenia samodzielnego gorącego ligandu				Nieoznakowane rozcieńczenia E2 do kolumn płytki 4–6	Rozcieńczenia [3H]E2 do kolumn płytki 1–9
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ receptor estrogenowy			0,0313 nM [3H] E2+ 0,0625 µM E2+ receptor estrogenowy			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ receptor estrogenowy			0,0625 nM [3H] E2+ 0,125 µM E2+ receptor estrogenowy			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [3H] E2+ receptor estrogenowy			0,125 nM [3H] E2+ 0,25 µM E2+ receptor estrogenowy			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ receptor estrogenowy			0,250 nM [3H] E2+ 0,5 µM E2+ receptor estrogenowy			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ receptor estrogenowy			0,50 nM [3H] E2+ 1 µM E2+ receptor estrogenowy			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ receptor estrogenowy			1,00 nM [3H] E2+ 2 µM E2+ receptor estrogenowy			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ receptor estrogenowy			2,00 nM [3H] E2+ 4 µM E2+ receptor estrogenowy			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ receptor estrogenowy			4,00 nM [3H] E2+ 8 µM E2+ receptor estrogenowy			4,00 nM				80 µM	40 nM

TB: wiązanie całkowite;
NSB: wiązanie nieswoiste;
[^{3}H] E_2: [^{3}H]17β-estradiol
E2: nieoznakowany 17β-estradiol
(*) Wskazane tutaj stężenia stanowią stężenia końcowe każdego dołka.
(**) Rozcieńczenia nieoznakowanych E2 i [^{3}H]E2 można przygotować na innej płytce.

▼**M8**

Tabela 3

Objętości odczynnika w odniesieniu do nasycenia mikropłytki

Nr pozycji		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Etap przygotowania		Dołki TB			Dołki NSB			Samodzielny gorący ligand		
Objętość elementów w odniesieniu do powyższych dołków reakcyjnych oraz kolejność dodawania	Roztwór buforowy	60 µl			50 µl			90 µl		
	nieoznakowane E2 z pozycji 11 tabeli 2	–			10 µl			–		
	[3H]E2 z pozycji 12 w tabeli 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Całkowita objętość reakcji		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubacja		**REAKCJA NASTĘPUJĄCA PO 2 GODZINACH INKUBACJI**						Określenie ilościowe radioaktywności tuż po przygotowaniu. Brak inkubacji		
Poddawanie działaniu substancji za pomocą 0,4 % DCC		Tak			Tak			**Nie**		
Objętość 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			–		
Filtracja		Tak			Tak			Nie		
POMIAR LICZBY ROZPADÓW NA MINUTĘ										
Objętość ilościowa dodawana do koktajlu scyntylacyjnego		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Jeżeli scyntylacyjny licznik cieczowy mikropłytek stosuje się do pomiaru liczby rozpadów na minutę, nie należy przygotowywać samego gorącego ligandu w dołkach TB i NSB na tej samej płytce testowej. Samodzielny gorący ligand należy przygotować na innej płytce.

(**) Jeżeli DCC rozdziela się metodą wirowania, aby uniknąć zanieczyszczenia DCC należy za pomocą scyntylacyjnego licznika cieczowego zmierzyć 50 µl supernatantu.

19. Mikropłytki testowe pozwalające na określenie wiązań całkowitych i wiązań nieswoistych należy przez dwie godziny inkubować w temperaturze pokojowej (22–28 °C).

Pomiar [^{3}H]-17β-estradiolu związanego z hrERα

20. Po dwugodzinnym okresie inkubacji [^{3}H]-17β-estradiol związany z hrERα należy oddzielić od wolnego [^{3}H]-17β-estradiolu, w tym celu dodając do dołków 100 µl lodowatej zawiesiny DCC 0,4 %. Płytki należy następnie na 10 min umieścić z lodem oraz poprzez przeniesienie ich do filtra mikropłytek należy przeprowadzić filtrację mieszaniny reakcyjnej i zawiesiny DCC; celem tego działania jest usunięcie DCC. Następnie do płynu scyntylacyjnego znajdującego się we fiolkach scyntylacyjnego licznika cieczowego należy dodać 100 µl filtratu, aby za pomocą tego licznika określić liczbę rozpadów na minutę/fiolkę.

▼M8

21. W przypadku gdy filtr mikropłytkowy nie jest dostępny, metodą alternatywną może okazać się usunięcie DCC poprzez odwirowanie. 50 µl supernatantu zawierającego [^{3}H]-17β-estradiol związany z hrERα należy wówczas stosować ze szczególną ostrożnością, aby uniknąć zanieczyszczenia dołków przez styczność z DCC, a następnie umieścić na drugiej mikropłytce.

22. Stan, w jakim znajduje się samodzielny gorący ligand pozwala określić liczbę rozpadów na minutę dodawanego do dołków testowych [^{3}H]-17β-estradiolu. Radioaktywność należy określić ilościowo tuż po przygotowaniu. Dołków tych nie powinno się inkubować, a także nie należy poddawać ich działaniu zawiesiny DCC, natomiast ich zawartość należy wprowadzić bezpośrednio do płynu scyntylacyjnego. Pomiary te pokazują, ile [^{3}H]-17β-estradiolu wyrażonych za pomocą liczby rozpadów na minutę dodano do każdego zestawu dołków w celu uzyskania wiązania całkowitego i wiązania nieswoistego.

Test wiązania konkurencyjnego

23. W teście wiązania konkurencyjnego mierzy się wiązanie pojedynczego stężenia [^{3}H]17β-estradiolu w obecności zwiększających się stężeń badanej substancji chemicznej. Przy każdym stężeniu w ramach jednej serii badawczej należy zastosować trzy równoległe kontrpróby. Ponadto dla każdej badanej substancji chemicznej należy wykonać trzy niejednoczesne serie badawcze. Test należy przeprowadzić z wykorzystaniem co najmniej jednej płytki 96-dołkowej.

Kontrole

24. Podczas przeprowadzania testu w każdym doświadczeniu należy uwzględnić równoczesny rozpuszczalnik i kontrole (tj. estrogen odniesienia, substancję słabo wiążącą oraz substancję inną niż substancja wiążąca). Pełne krzywe stężeń dla estrogenów odniesienia i kontroli (tj. substancji słabo wiążącej i substancji innej niż substancja wiążąca) w każdej serii badawczej należy stosować na jednej płytce. Wszystkie pozostałe płytki powinny zawierać (i) wysokie (maksymalne przemieszczenie tj. w przybliżeniu pełne przemieszczenie ligand znakowanych izotopem) i średnie (około IC_{50}) stężenie E2 oraz substancji słabo wiążącej w trzech powtórzeniach; (ii) kontrolę z rozpuszczalnikiem i wiązanie nieswoiste, każde w trzech powtórzeniach. Procedury przygotowania buforu testowego, [^{3}H]-17β-estradiolu, hrERα i roztworów badanych substancji chemicznych szczegółowo opisano w protokole CERI (2).

Kontrola z rozpuszczalnikiem:

25. Kontrola z rozpuszczalnikiem wskazuje, że rozpuszczalnik nie wchodzi w interakcję z układem badawczym, a także umożliwia zmierzenie wiązania całkowitego (TB). Preferowanym rozpuszczalnikiem jest sulfotlenek dimetylowy. W przypadku gdy najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej nie jest rozpuszczalne w sulfotlenku dimetylowym, alternatywnie można zastosować etanol. Stężenie sulfotlenku dimetylowego w dołkach testu końcowego powinno wynosić 2,05 %, a w przypadku braku nierozpuszczalności badanej substancji chemicznej może wzrosnąć do poziomu 2,5 %. Ze względu na interferencję wyższych stężeń rozpuszczalnika z danym testem, nie należy stosować stężeń sulfotlenku dimetylowego wyższych niż 2,5 %. W przypadku substancji chemicznych, które są nierozpuszczalne w sulfotlenku dimetylowym, lecz są rozpuszczalne w etanolu, w teście bez interferencji można zastosować maksymalnie etanol o stężeniu 2 %.

Kontrola z buforem:

26. Kontrola z buforem (BC) nie powinna zawierać rozpuszczalnika ani badanej substancji chemicznej, ale wszystkie inne elementy testu. Wyniki kontroli z buforem porównuje się z wynikami kontroli z rozpuszczalnikiem w celu sprawdzenia, czy zastosowany rozpuszczalnik nie ma wpływu na system testu.

▼M8

Substancja silnie wiążąca (estrogen odniesienia)

27. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) jest endogennym ligandem i tworzy wiązanie o wysokim powinowactwie z receptorem estrogenowym, podtyp alfa. Dla każdego testu wiązania konkurencyjnego hrERα należy przygotować krzywą wzorcową z użyciem nieoznakowanego 17β-estradiolu, aby w tym samym laboratorium umożliwić ocenę zmienności podczas wykonywania testu na przestrzeni czasu. W sulfotlenku dimetylowym i buforze testowym należy przygotować osiem roztworów nieoznakowanego 17β-estradiolu o stężeniach w dołkach testowych należy stosować na krzywej wzorcowej, w następujących odstępach: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8.5}$, 10^{-9}, $10^{-9.5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Najwyższe stężenie nieoznakowanego 17β-estradiolu (1 μM) powinno służyć również jako wskaźnik nieswoistego wiązania. Stężenie to wyróżnia się etykietą „NSB” w tabeli 4, mimo że jest ono również częścią krzywej wzorcowej.

Substancja słabo wiążąca

28. Należy uwzględnić substancję słabo wiążącą (noretynodrel (CAS 68-23-5) lub jego zastępcę – noretyndron (CAS 68-22-4)) w celu wykazania czułości każdego doświadczenia i umożliwienia oceny zmienności przy przeprowadzaniu testu z upływem czasu. W sulfotlenku dimetylowym i buforze testowym należy przygotować osiem roztworów substancji słabo wiążącej o następujących stężeniach w dołkach testowych: $10^{-4.5}$, $10^{-5.5}$, 10^{-6}, $10^{-6.5}$, 10^{-7}, $10^{-7.5}$, 10^{-8} i 10^{-9} M.

Substancja inna niż substancja wiążąca

29. Oktylotrietoksysilan (OTES, CAS 2943-75-1) należy stosować jako kontrolę ujemną (substancję inną niż substancja wiążąca). Daje to pewność, że test w takiej formie umożliwi wykrycie, że badane substancji chemiczne nie wiążą się z hrERα. W sulfotlenku dimetylowym i buforze testowym należy przygotować osiem roztworów substancji innej niż substancja wiążąca o następujących stężeniach w dołkach testowych: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Jako alternatywną substancję inną niż substancja wiążąca można zastosować ftalan dibutylu (DBP, nr CAS 84-72-2), można go jednak badać jedynie do 10^{-4}M. Wykazano, że maksymalna rozpuszczalność DBP w teście wynosi 10^{-4} M.

Stężenie hrERα

30. Należy stosować taką ilość receptora, która da specyficzne wiązanie 40 ±10 % 1 nM radioligandu (zob. pkt 12–13 dodatku 3). Roztwór hrERα należy przygotować, rozcieńczając funkcjonalne hrERα w lodowatym buforze testowym bezpośrednio przed zastosowaniem.

[^{3}H]-17β-estradiol

31. Stężenie końcowe [^{3}H]-17β-estradiolu w dołkach testowych powinno wynosić 0,5 nM.

Badane substancje chemiczne

32. W pierwszej kolejności konieczne jest przeprowadzenie badania rozpuszczalności, aby ustalić granicę rozpuszczalności każdej badanej substancji chemicznej oraz określić właściwy zakres stężeń, który zostanie zastosowany przy realizacji protokołu badania. Granicę rozpuszczalności każdej badanej substancji chemicznej należy początkowo ustalić w rozpuszczalniku, a następnie potwierdzić w warunkach testowych. Stężenia końcowe będące przedmiotem testu nie powinny przekraczać 1 mM. Badanie ustalające zakres dawkowania obejmuje kontrolę z rozpuszczalnikiem wraz z co najmniej ośmioma seriami stężeń wzrastających w postępie logarytmicznym, począwszy od maksymalnego dopuszczalnego stężenia (np. 1 mM lub niższego, na podstawie granicy rozpuszczalności) oraz odnotowaną obecność zmętnienia lub osadu (zob. również pkt 35 dodatku 3). Po ustaleniu zakresu stężeń do celów badań, badaną substancję chemiczną należy badać przy użyciu 8 krzywych stężeń logarytmicznych, ułożonych w odpowiednich

▼M8

odstępach, co określono w poprzednim badaniu dotyczącym zakresu dawkowania. Zbadane stężenia w drugim i trzecim doświadczeniu należy następnie odpowiednio dostosować, aby w razie potrzeby lepiej scharakteryzować krzywą zależności stężenie-odpowiedź.

33. Rozcieńczenia badanych substancji chemicznych należy przygotować w odpowiednim rozpuszczalniku (zob. pkt 25 dodatku 3). Badana substancja chemiczna w najwyższym stężeniu nie rozpuszcza się ani w sulfotlenku dimetylowym, ani w etanolu, a dodanie większej ilości rozpuszczalnika spowodowałoby, że stężenie rozpuszczalnika w końcowej probówce byłoby wyższe niż dopuszczalna wartość graniczna, najwyższe stężenie można obniżyć do następnego, niższego stężenia. W takim przypadku można dodać dodatkowe stężenie na dolnym końcu serii stężeń. Pozostałe stężenia w serii powinny pozostać niezmienione.

34. Roztwory badanej substancji chemicznej powinny być ściśle monitorowane po dodaniu ich do dołka testowego, ponieważ badana substancja chemiczna może wytrącać się po dodaniu do dołka testowego. Dane dotyczące wszystkich dołków, które zawierają osady, należy wyłączyć z dopasowywania krzywej, a także odnotować powód wyłączenia tych danych.

35. Jeżeli istnieją już wcześniejsze informacje pochodzące z innych źródeł, na podstawie których można wyznaczyć logarytm (IC_{50}) badanej substancji chemicznej, właściwe może być geometryczne rozmieszczenie rozcieńczeń bliżej zakładanego log (IC_{50}) (tj. 0,5 jednostki logarytmicznej). Wyniki końcowe powinny dostatecznie wykazywać wystarczającą rozpiętość stężeń po obu stronach logarytmu (IC_{50}), w tym „najwyższa wartość" i „najniższa wartość", tak aby krzywą wiązania można było odpowiednio scharakteryzować.

Organizacja płytki testowej

36. Oznakowane mikropłytki powinny być przygotowane z zastosowaniem: sześciokrotnej inkubacji kontroli z rozpuszczalnikiem, najwyższego stężenia estrogenu odniesienia (E2), który służy również za wskaźnik wiązania nieswoistego (NSB), kontroli z buforem, oraz potrójnych inkubacji dla każdego z ośmiu stężeń niewiążących kontroli (oktylotrietoksysilan), siedmiu niższych stężeń estrogenu odniesienia (E2), ośmiu stężeń substancji słabo wiążącej (noretynodrelu lub noretysteronu) oraz ośmiu stężeń każdej badanej substancji chemicznej (TC). W poniższej tabeli 4 przedstawiono przykładowy wykres dotyczący rozkładu na płytce pełnych krzywych stężeń estrogenu odniesienia i kontroli. Dodatkowe mikropłytki wykorzystuje się do badanych substancji chemicznych i powinny one zawierać kontrole płytek, (tj. (i) wysokie (maksymalne przemieszczenie) i średnie stężenie (około IC_{50}) każdego E2 oraz substancji słabo wiążącej w trzech powtórzeniach; (ii) kontrolę z rozpuszczalnikiem (jako wiązanie całkowite) i wiązanie nieswoiste, każde w sześciu powtórzeniach (tabela 5). Przykład arkusza roboczego rozkładu mikropłytki testowej, wykorzystującego trzy nieznane badane substancje chemiczne, znajduje się w dodatku 3.3. Stężenia wskazane w arkuszu roboczym oraz w tabelach 4 i 5 odnoszą się do stężeń końcowych wykorzystywanych w poszczególnych dołkach testowych. Maksymalne stężenie dla E2 powinno wynosić 1×10^{-7} M, a dla substancji słabo wiążącej należy stosować najwyższe stężenie dla substancji słabo wiążącej na płytce 1. Stężenie IC_{50} musi być określone przez laboratorium na podstawie jego bazy danych historycznych dotyczących kontroli. Oczekuje się, że wartość ta będzie podobna do wartości zaobserwowanej w badaniach walidacyjnych (zob. tabela 1).

▼**M8**

Tabela 4

Rozkład na mikropłytce do testu wiązania konkurencyjnego ([1]) ([2]), pełne krzywe stężeń dla estrogenu odniesienia i próby kontrolnej (płytka 1)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Kontrola z buforem i kontrola dodatnia (E2)			Słaba dodatnia (Noretynodrel)			Kontrola ujemna (OTES)			TB i NSB		
A	Próba ślepa (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (kontrola z rozpuszczalnikiem) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Kontrola z buforem		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Próba ślepa (dla gorących) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Próbka przygotowana na potrzeby standardów, w których każde doświadczenie przeprowadza się z wykorzystaniem mikropłytki.
([2]) Należy zauważyć, że taką mikropłytkę przygotowuje się wykorzystując rozcieńczenia wytworzone na płytce rozcieńczenia opisanej w odniesieniu do standardów w poprzednich sekcjach.
W tym przykładzie substancją słabo wiążącą jest noretynodrel (NE)
(*) prawdziwa próba ślepa, bez wykorzystania dołka
(**) próba ślepa niestosowana podczas inkubacji, ale stosowana w celu potwierdzenia całkowitej dodanej radioaktywności.

Tabela 5

Rozkład na mikropłytce testowej wiązania konkurencyjnego, dodatkowe płytki na użytek badanych substancji chemicznych (TC) i próby kontrolne dla płytki

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Badana substancja chemiczna-1 (TC-1)			Badana substancja chemiczna-2 (TC-2)			Badana substancja chemiczna-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)			E_2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10^{-4,5}$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 z rozpuszczalnikiem)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

W tym przykładzie substancją słabo wiążącą jest noretynodrel (NE)

▼M8

Zakończenie testu wiązania konkurencyjnego

37. Jak pokazano w tabeli 6, z wyjątkiem dołków dotyczących wiązania całkowitego i prób ślepych (dla gorących), w każdym dołku należy umieścić 50 µl bufora testowego oraz wymieszać z 10 µl kontroli z rozpuszczalnikiem, estrogenu odniesienia (E2), substancji słabo wiążącej, substancji innej niż substancja wiążąca i badanych substancji chemicznych, odpowiednio, 10 µl z 5 nM roztworu [3H]-17β-estriadolu. Następnie do każdej płytki dodaje się 30 µl lodowatego roztworu receptora i miesza się delikatnie. Roztwór hrERα należy dodać na końcu. Mikropłytki testowe należy inkubować w temperaturze pokojowej (22–28 °C) przez dwie godziny.

Tabela 6

Objętość elementów testu w odniesieniu do testu wiązania konkurencyjnego hrER, mikropłytki

Etapy przygotowania		Inne niż dołki TB	Dołki TB	Próba ślepa (dla gorących)
Objętość elementów w odniesieniu do powyższych dołków reakcyjnych oraz kolejność dodawania	Bufor testowy w temperaturze pokojowej	50 µl	60 µl	90 µl
	Nieoznakowane E2, substancja słabo wiążąca, substancja inna niż substancja wiążąca, rozpuszczalnik oraz badane substancje chemiczne (*)	10 µl	–	–
	Stężenie końcowe [3H]-17β-estradiolu względem przyrostu 0,5 nM (tj. 5 nM).	10 µl	10 µl	10 µl
	Ustalone stężenie hrERα (zob. pkt 12–13)	30 µl	30 µl	–
Całkowita objętość w każdym dołku testowym		100 µl	100 µl	100 µl

(*) prawidłowo przygotowane w celu uzyskania stężenia końcowego w ramach dopuszczalnego stężenia rozpuszczalnika

38. Oznaczenie ilościowe [^{3}H]-17β-estradiolu związanego z hrERα po oddzieleniu [^{3}H]-17β-estradiolu związanego z hrERα od wolnego [^{3}H]-17β-estradiolu poprzez dodanie 100 µl lodowatej zawiesiny DCC do każdego dołka należy następnie przeprowadzić jak opisano w dodatku 3 w pkt 21–23 w odniesieniu do testu wiązania nasycenia.

39. Dołki G10–12 oraz H10–12 [oznaczone w tabeli 4 jako próby ślepe (dla gorących)] reprezentują DPM estradiolu oznakowanego [^{3}H] w 10 µl. Podwielokrotność 10 µl należy dodać bezpośrednio do płynu scyntylacyjnego.

Kryteria dopuszczalności

Test wiązania nasycenia

40. Krzywa wiązania specyficznego powinna osiągnąć stan równowagi, ponieważ zastosowano zwiększające się stężenia [^{3}H]-17β-estradiolu, wskazujące na nasycenie hrERα ligandem.

41. Wiązanie specyficzne przy 0,5 nM [^{3}H]-17β-estradiolu powinno mieścić się w dopuszczalnym zakresie 30–50 % średniej zmierzonej całkowitej radioaktywności dodanej we wszystkich seriach badawczych. Sporadyczne niewielkie odchylenia poza ten zakres są dopuszczalne, ale jeśli wyniki serii badawczych systematycznie nie mieszczą się w tym zakresie lub wynik danej serii badawczej wychodzi znacznie poza ten zakres, należy dostosować stężenie białka i powtórzyć test nasycenia.

▼M8

42. Dane powinny tworzyć liniowy wykres Scatcharda.

43. Wiązania nieswoiste nie powinny być nadmierne. Wartość dla wiązań nieswoistych powinna zazwyczaj wynosić < 35 % wiązań całkowitych. Stosunek ten może jednak sporadycznie przekraczać tę granicę przy pomiarze bardzo niskich DPM dla najniższego stężenia badanego 17β-estradiolu znakowanego izotopem.

Test wiązania konkurencyjnego

44. Zwiększające się stężenia nieoznakowanego 17β-estradiolu powinny wyprzeć [^{3}H]-17β-estradiol z receptora w sposób zgodny z jednoobszarowym wiązaniem konkurencyjnym.

45. Wartość IC_{50} dla estrogenu odniesienia (tj. 17β-estradiolu) powinna być w przybliżeniu równa stężeniu molowemu [^{3}H]-17β-estradiolu powiększonemu o Kd oznaczony w teście wiązania nasycenia.

46. Całkowite wiązanie specyficzne powinno być spójne w dopuszczalnym zakresie 40 ± 10 %, gdy średnie zmierzone stężenie całkowitej radioaktywności dodanej do każdego dołka wynosi 0,5 nM we wszystkich seriach badawczych. Sporadyczne niewielkie odchylenia poza ten zakres są dopuszczalne, ale jeśli wyniki serii badawczych systematycznie nie mieszczą się w tym zakresie lub wynik danej serii badawczej wychodzi znacznie poza ten zakres, należy dostosować stężenie białka.

47. Rozpuszczalnik nie powinien powodować zmiany czułości ani odtwarzalności testu. Wyniki kontroli z rozpuszczalnikiem (dołki z wiązaniem całkowitym) porównuje się z wynikami kontroli z buforem w celu sprawdzenia, czy zastosowany rozpuszczalnik nie ma wpływu na system testu. Wyniki kontroli wiązania całkowitego i kontroli z buforem powinny być porównywalne, jeżeli rozpuszczalnik nie wpływa na test.

48. Substancja inna niż substancja wiążąca nie powinna wypierać więcej niż 25 % [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα podczas badania do 10^{-3} M (OTES) lub 10^{-4} M (DBP).

49. Opracowano kryteria efektywności dla estrogenu odniesienia i dwóch substancji słabo wiążących (np. noretynodrel, noretyndron) z wykorzystaniem danych z badania walidacyjnego dotyczącego testu wiązania hrER CERI (załącznik N do 2 pozycji bibliografii). 95 % przedziały ufności podano w odniesieniu do średniej ± SD (n) wszystkich kontrolnych serii badawczych przeprowadzanych w czterech laboratoriach, które wzięły udział w badaniu walidacyjnym. 95 % przedziały ufności obliczono dla parametrów dopasowania krzywej (tj. najwyższa wartość, najniższa wartość, krzywa Hilla, logarytm IC_{50}) dla estrogenu odniesienia i substancji słabo wiążących oraz dla $\log_{10}$RBA substancji słabo wiążących w stosunku do estrogenu odniesienia. W tabeli 1 przedstawiono oczekiwane zakresy parametrów dopasowania krzywej, które mogą być wykorzystane jako kryteria efektywności. W praktyce zakres IC_{50} może się nieznacznie różnić w zależności od doświadczalnie wyprowadzonego Kd preparatu receptora i stężenia ligandu wykorzystanego w teście.

50. Nie opracowano kryteriów efektywności w odniesieniu do parametrów dopasowania krzywej dla badanych substancji chemicznych ze względu na szeroki wachlarz istniejących potencjalnych badanych substancji chemicznych i zmienność potencjalnych powinowactw i wyników (np. pełna krzywa, krzywa częściowa, brak dopasowania krzywej). Dokonując przeglądu wyników z każdej serii badawczej badanej substancji chemicznej, należy jednak przyjąć profesjonalny osąd. Należy zastosować wystarczający zakres stężeń badanej substancji chemicznej, aby wyraźnie określić najwyższą

▼M8

wartość (np. 90–100 % wiązania) konkurencyjnej krzywej. Zmienność wśród kontrprób przy każdym stężeniu badanej substancji chemicznej, jak również wśród 3 niejednoczesnych serii badawczych powinna być uzasadniona i poparta naukowo. Kontrole z każdej serii badawczej badanej substancji chemicznej powinny zbliżać się do miar efektywności zgłoszonych dla tego testu CERI i powinny być spójne z danymi historycznymi dotyczącymi kontroli z każdego odpowiedniego laboratorium.

ANALIZA DANYCH

Test wiązania nasycenia

51. Dokonuje się pomiaru zarówno wiązania całkowitego, jak i nieswoistego. W przypadku tych wartości wiązanie swoiste wzrastających stężeń [^{3}H]-17β-estradiolu w warunkach równowagi jest obliczane przez odjęcie wiązania nieswoistego od całkowitego. Wykres stężenia wiązań specyficznych w porównaniu ze stężeniem [^{3}H]-17β-estradiolu powinien osiągnąć plateau dla maksymalnego wiązania specyficznego wskazującego na nasycenie hrERα [^{3}H]-17β-estradiolem. Ponadto analiza danych powinna dokumentować wiązanie estradiolu [^{3}H]-17β-estradiolu z pojedynczym obszarem wiązania o wysokim powinowactwie. Wiązanie nieswoiste, całkowite i swoiste powinno być prezentowane na krzywej wiązania nasycenia. W dalszej analizie tych danych należy wykorzystać analizę regresji nieliniowej (np. BioSoft; McPherson 1985; Motulsky 1995) z końcowym prezentowaniem danych w formie wykresu Scatcharda.

52. W analizie danych należy określić Bmax i Kd wyłącznie na podstawie danych dotyczących wiązania całkowitego, przy założeniu, że wiązanie nieswoiste jest liniowe, chyba że podano uzasadnienie dla zastosowania innej metody. Ponadto przy określaniu najlepszego dopasowania należy stosować regresję odpornościową, chyba że zostanie podane uzasadnienie. Należy podać metodę wybraną dla regresji odpornościowej. Korektę obniżenia stężenia ligandu (np. przy użyciu metody na podstawie Swillens 1995) należy zawsze stosować przy określaniu Bmax i Kd na podstawie danych dotyczących wiązania nasycenia.

Test wiązania konkurencyjnego

53. Krzywa wiązania konkurencyjnego jest wykreślona jako krzywa wiązania specyficznego [^{3}H]-17β-estradiolu w stosunku do stężenia (log10 jednostek) konkurenta. Stężenie badanej substancji chemicznej, która hamuje 50 % maksymalnego wiązania specyficznego [^{3}H]-17β-estradiolu, jest wartością IC_{50}.

54. Szacunki wartości logarytmu (IC_{50}) dla kontroli dodatnich (np. estrogen odniesienia i substancja słabo wiążąca) należy określić, wykorzystując właściwe oprogramowanie dopasowane do krzywej nieliniowej, aby pasowały do równania Hilla o czterech parametrach (np. BioSoft; McPherson 1985; Motulsky 1995). Najwyższą wartość, najniższą wartość, krzywą Hilla i logarytm IC_{50} należy zasadniczo pozostawić bez ograniczeń przy dopasowywaniu tych krzywych. Regresję odpornościową należy stosować przy określaniu najlepszego dopasowania, chyba że podane zostanie uzasadnienie. Nie należy stosować korekty obniżenia stężenia ligandu. Po przeprowadzeniu analizy wstępnej każda krzywa wiązania powinna zostać poddana przeglądowi w celu zapewnienia odpowiedniego dopasowania do modelu. Względne powinowactwo wiązania (RBA) w odniesieniu do substancji słabo wiążącej należy obliczać jako procent logarytmu (IC_{50}) dla substancji słabo wiążącej względem logarytmu (IC_{50}) dla 17β-estradiolu. Wyniki kontroli dodatnich i kontroli substancji innych niż substancja wiążąca powinny być oceniane przy użyciu pomiarów efektywności testu określonych w pkt 44–49 niniejszego dodatku 3.

▼M8

55. Dane dotyczące wszystkich badanych substancji chemicznych należy analizować na zasadzie stopniowego podejścia, aby zapewnić odpowiednią analizę danych i właściwą klasyfikację każdej krzywej wiązania konkurencyjnego. Zaleca się, aby każda seria badawcza badanej substancji chemicznej została wstępnie poddana znormalizowanej analizie danych, która jest identyczna z analizą stosowaną w przypadku kontroli estrogenu odniesienia i substancji słabo wiążącej (zob. pkt 54 niniejszego dodatku 3). Po zakończeniu należy przeprowadzić przegląd techniczny parametrów dopasowania krzywej, jak również wizualny przegląd stopnia, w jakim dane pasują do wygenerowanej krzywej wiązania konkurencyjnego dla każdej serii badawczej. W trakcie tego przeglądu technicznego obserwacje zależnego od stężenia spadku w procentach [^{3}H]-17β-estradiolu związanego specyficznie, małej zmienności pomiędzy kontrpróbami technicznymi przy stężeniu każdej badanej substancji chemicznej oraz spójności parametrów dopasowania pomiędzy trzema seriami badawczymi stanowią dobrą wskazówkę, że test i analizy danych zostały przeprowadzone prawidłowo.

Interpretacja danych

56. O ile spełnione są wszystkie kryteria dopuszczalności, badaną substancję chemiczną uważa się za substancję wiążącą w odniesieniu do hrERα, jeżeli krzywa wiązania może być dopasowana, a najniższy punkt na krzywej reakcji w zakresie danych wynosi mniej niż 50 % (rysunek 1).

57. O ile spełnione są wszystkie kryteria dopuszczalności, badaną substancję chemiczną uważa się za substancję inną niż substancja wiążąca w odniesieniu do hrERα, jeśli:

— krzywa wiązania może być dopasowana, a najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji w zakresie danych wynosi powyżej 75 %, lub

— krzywa wiązania nie może być dopasowana, a najniższy niewygładzony średni procent wiązania wśród grup stężeń w danych wynosi powyżej 75 %.

58. Badane substancje chemiczne uważa się za niejednoznaczne, jeśli zostanie spełniony żaden z powyższych warunków (np. najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji mieści się pomiędzy 76 a 51 %).

Tabela 7

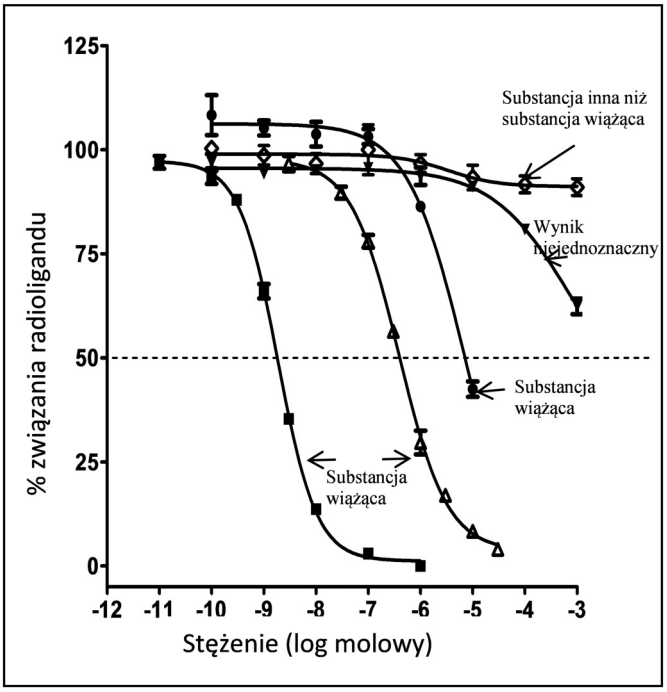
Kryteria przypisywania klasyfikacji na podstawie krzywej wiązania konkurencyjnego w odniesieniu do badanej substancji chemicznej

Klasyfikacja	Kryteria
Substancja wiążąca[a]	Krzywa wiązania może być dopasowana. **Najniższy punkt na krzywej reakcji w zakresie danych wynosi mniej niż 50 %**.
Substancja inna niż substancja wiążąca[b]	Jeżeli krzywa wiązania może być dopasowana, **najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji w zakresie danych wynosi powyżej 75 %**. Jeżeli krzywa wiązania nie może być dopasowana, **najniższy niewygładzony średni odsetek wiązania wśród grup stężeń w danych wynosi powyżej 75 %**.
Wynik niejednoznaczny[c]	Każda sprawdzalna seria badawcza, która nie dotyczy substancji wiążącej, ani substancji innej niż substancja wiążąca (np. najniższy punkt na dopasowanej krzywej reakcji mieści się w granicach 76–51 %).

▼M8

Rysunek 1

Przykłady klasyfikacji badanej substancji chemicznej z wykorzystaniem krzywej wiązania konkurencyjnego



59. Wielokrotne serie badawcze prowadzone w laboratorium w przypadku badanej substancji chemicznej są łączone poprzez przypisanie wartości liczbowych do każdej serii badawczej i uśrednienie wszystkich serii, jak pokazano w tabeli 8. Wyniki połączonych serii badawczych w każdym laboratorium są porównywane z oczekiwaną klasyfikacją każdej badanej substancji chemicznej.

Tabela 8

Metoda klasyfikacji badanej substancji chemicznej z wykorzystaniem wielu serii badawczych w laboratorium

Przypisanie wartości do każdej serii badawczej:	
Klasyfikacja	**Wartość liczbowa**
Substancja wiążąca	2
Wynik niejednoznaczny	1
Substancja inna niż substancja wiążąca	0
Klasyfikacja średniej wartości liczbowej w poszczególnych seriach badawczych:	
Klasyfikacja	**Wartość liczbowa**
Substancja wiążąca	Średnia ≥ 1,5
Wynik niejednoznaczny	0,5 ≤ Średnia < 1,5
Substancja inna niż substancja wiążąca	Średnia < 0,5

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

60. Zob. pkt 24 „ELEMENTÓW TESTU WIĄZANIA hrER” w niniejszej metodzie badawczej.

▼**M8**

Dodatek 3.1

WYKAZ POJĘĆ

[^{3}H]E2: 17β-estradiol znakowany izotopem z trytem

DCC: Węgiel drzewny pokryty dekstranem

E_2: Nieoznakowany 17β-estradiol (obojętny)

Bufor testowy: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, zawierający 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM $NaVO_3$, 10 % gliceryny, 0,2 mM leupeptinu, 1 mM ditiotreitolu i 10 mg/ml albuminy surowicy bydlęcej.

hrERα: Ludzki rekombinowany receptor estrogenowy alfa (domena wiążąca ligand)

Kontrpróba: Jeden z wielu dołków, które mają tę samą zawartość z tym samym stężeniem i są poddawane testowi jednocześnie w ramach jednej serii badawczej. W niniejszym protokole każde stężenie badanej substancji chemicznej jest badane w trzech powtórzeniach; oznacza to, że istnieją trzy kontrpróby, które są testowane jednocześnie przy każdym stężeniu badanej substancji chemicznej.

Seria badawcza: Pełen zestaw poddawanych jednocześnie serii badawczej dołków mikropłytki, który dostarcza wszelkich informacji niezbędnych do scharakteryzowania wiązania badanej substancji chemicznej z hrERα (tj. całkowity [^{3}H]-17β-estradiol dodany do dołka testowego, maksymalne wiązanie [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα, wiązanie niespecyficzne, oraz wiązanie całkowite przy różnych stężeniach badanej substancji chemicznej). W serii badawczej można wykorzystać tylko jeden dołek (tj. kontrpróbę) na każde stężenie, ale ponieważ niniejszy protokół wymaga trzykrotnego przeprowadzania testu, w jednej analizie wykorzystuje się trzy dołki na każde stężenie. Niniejszy protokół wymaga ponadto przeprowadzenia trzech niezależnych (tj. nierównoczesnych) serii badawczych w odniesieniu do każdej substancji chemicznej.

▼**M8**

Dodatek 3.2

ROZKŁAD DOŁKÓW W TEŚCIE WIĄZANIA KONKURENCYJNEGO

Płytka	**Pozycja**	**Kontrpróba**	**Rodzaj dołka**	**Kod dołka**	**Kod stężenia**	**Stężenie początkowe konkurenta (M)**	**Roztwór podstawowy hrER (µl)**	**Objętość buforu (µl)**	**Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)**	**Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)**	**Ostateczna objętość (µl)**	**Stężenie końcowe konkurenta (M)**
S	A1	1	Ślepa próba	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Ślepa próba	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Ślepa próba	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	zimne E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	zimne E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	zimne E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	zimne E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	zimne E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	zimne E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	zimne E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	zimne E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	zimne E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	zimne E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	zimne E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	zimne E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	zimne E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	zimne E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	zimne E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	zimne E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

▼M8

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
S	G2	2	zimne E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	zimne E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	zimne E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	zimne E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	zimne E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	noretynodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretynodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretynodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretynodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretynodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretynodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretynodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretynodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretynodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretynodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretynodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretynodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretynodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	noretynodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretynodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

▼**M8**

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
S	F4	1	noretynodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretynodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretynodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretynodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretynodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretynodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	noretynodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretynodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretynodrel	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**

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe 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	wiązanie całkowite	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	wiązanie całkowite	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	wiązanie całkowite	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	wiązanie całkowite	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
S	B11	5	wiązanie całkowite	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	wiązanie całkowite	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	zimne E2 (wysokie)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	zimne E2 (wysokie)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	zimne E2 (wysokie)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	zimne E2 (wysokie)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	zimne E2 (wysokie)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

▼**M8**

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
S	D12	6	zimne E2 (wysokie)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Kontrola z buforem	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Kontrola z buforem	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Kontrola z buforem	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Kontrola z buforem	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Kontrola z buforem	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Kontrola z buforem	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Próba ślepa Gorąca (dla gorących)		H1	—	90	—	10	—	100	—
S	G11 (*)	2	Próba ślepa Gorąca (dla gorących)		H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Próba ślepa Gorąca (dla gorących)		H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Próba ślepa Gorąca (dla gorących)		H4	—	90	—	10	—	100	—

▼**M8**

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
S	H11 (*)	5	Próba ślepa Gorąca (dla gorących)		H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Próba ślepa Gorąca (dla gorących)		H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Nieznany 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Nieznany 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Nieznany 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Nieznany 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Nieznany 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Nieznany 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Nieznany 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Nieznany 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Nieznany 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	Nieznany 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Nieznany 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Nieznany 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Nieznany 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Nieznany 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Nieznany 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Nieznany 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Nieznany 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Nieznany 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Nieznany 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Nieznany 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Nieznany 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Nieznany 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Nieznany 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

▼**M8**

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
P1	H3	3	Nieznany 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Nieznany 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Nieznany 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Nieznany 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Nieznany 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Nieznany 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Nieznany 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Nieznany 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Nieznany 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Nieznany 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Nieznany 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Nieznany 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Nieznany 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Nieznany 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	Nieznany 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Nieznany 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Nieznany 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Nieznany 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Nieznany 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Nieznany 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Nieznany 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Nieznany 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Nieznany 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Nieznany 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Nieznany 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Nieznany 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Nieznany 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

▼**M8**

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
P1	A9	3	Nieznany 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	Nieznany 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Nieznany 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Nieznany 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Nieznany 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Nieznany 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Nieznany 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Nieznany 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Nieznany 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Nieznany 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Nieznany 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Nieznany 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Nieznany 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Nieznany 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Nieznany 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	Nieznany 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Nieznany 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Nieznany 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Nieznany 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Nieznany 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Nieznany 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Nieznany 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Kontrola E2 (maks.)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Kontrola E2 (maks.)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Kontrola E2 (maks.)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Kontrola E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50

▼**M8**

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
P1	B11	2	Kontrola E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Kontrola E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	Kontrola NE (maks.)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Kontrola NE (maks.)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Kontrola NE (maks.)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Kontrola NE (IC50)	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Kontrola NE (IC50)	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Kontrola NE (IC50)	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	zimne E2 (wysokie)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	zimne E2 (wysokie)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	zimne E2 (wysokie)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	zimne E2 (wysokie)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	zimne E2 (wysokie)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	zimne E2 (wysokie)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	wiązanie całkowite	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	wiązanie całkowite	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	wiązanie całkowite	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—

▼**M8**

Płytka	Pozycja	Kontrpróba	Rodzaj dołka	Kod dołka	Kod stężenia	Stężenie początkowe konkurenta (M)	Roztwór podstawowy hrER (µl)	Objętość buforu (µl)	Objętość znacznika (gorącego E2) (µl)	Objętość z płytki do rozcieńczeń (µl)	Ostateczna objętość (µl)	Stężenie końcowe konkurenta (M)
P1	H10	4	wiązanie całkowite	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	wiązanie całkowite	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	wiązanie całkowite	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Należy pamiętać, że „gorące” dołki są puste podczas inkubacji. 10 µl dodaje się tylko w celu zliczania scyntylacji.

▼**M8**

Dodatek 4

UWAGI DOTYCZĄCE ANALIZY DANYCH UZYSKANYCH Z TESTÓW WIĄZANIA KONKURENCYJNEGO HRER

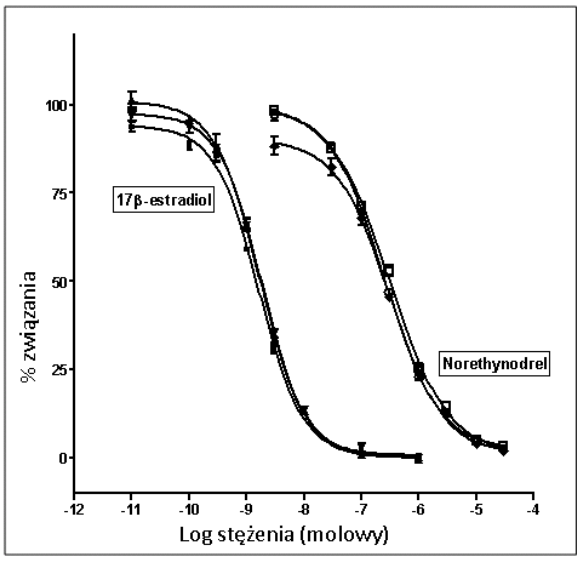
1. W teście wiązania konkurencyjnego hrERα mierzy się wiązanie pojedynczego stężenia [^{3}H]17β-estradiolu w obecności rosnących stężeń badanej substancji chemicznej. Krzywa wiązania konkurencyjnego jest wykreślona jako krzywa wiązania specyficznego [^{3}H]-17β-estradiolu w stosunku do stężenia (log10 jednostek) konkurenta. Stężenie badanej substancji chemicznej, która hamuje 50 % maksymalnego wiązania specyficznego [^{3}H]-17β-estradiolu jest wartością IC_{50}.

   Analiza danych w odniesieniu do estrogenu referencyjnego i substancji słabo wiążącej (1)

2. Dane uzyskane z kontrolnych serii badawczych przekształca się (tj. procent specyficznego wiązania [^{3}H]-17β-estradiolu oraz logarytmu stężenia badanej substancji chemicznej) na potrzeby dalszej analizy. Szacunki wartości logarytmu (IC50) dla kontroli dodatnich (np. estrogen odniesienia i substancja słabo wiążąca) należy określić, wykorzystując właściwe oprogramowanie dopasowane do krzywej nieliniowej, aby pasowały do równania Hilla o czterech parametrach (np. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Najwyższą wartość, najniższą wartość, krzywą Hilla i log(IC_{50}) można zasadniczo pozostawić bez ograniczeń przy dopasowywaniu tych krzywych. Regresję odpornościową należy stosować przy określaniu najlepszego dopasowania, chyba że podane zostanie uzasadnienie. Należy podać metodę wybraną dla regresji odpornościowej. Nie było potrzeby zastosowania korekty obniżenia stężenia ligandu w przypadku testów hrER Freybergera–Wilsona lub CERI, ale w stosownych przypadkach można to rozważyć. Po przeprowadzeniu analizy wstępnej każda krzywa wiązania powinna zostać poddana przeglądowi w celu zapewnienia odpowiedniego dopasowania do modelu. Względne powinowactwo wiązania (RBA) w odniesieniu do substancji słabo wiążącej można obliczać jako procent logarytmu (IC_{50}) dla substancji słabo wiążącej względem logarytmu (IC_{50}) dla 17β-estradiolu. Wyniki dotyczące kontroli dodatnich i kontroli substancji innych niż substancja wiążąca należy oceniać przy użyciu pomiarów efektywności testu i kryteriów dopuszczalności opisanych w niniejszej metodzie badawczej (pkt 20), dodatku 2 (test Freybergera–Wilsona, pkt 41–51) oraz w dodatku 3 (test CERI, pkt 41–51). Przykłady trzech prób serii badawczych dotyczących estrogenów odniesienia i substancji słabo wiążących przedstawiono na rysunku 1.

Rysunek 1

Przykłady krzywych wiązania konkurencyjnego dla estrogenu odniesienia kontrolnej substancji słabo wiążącej



▼M8

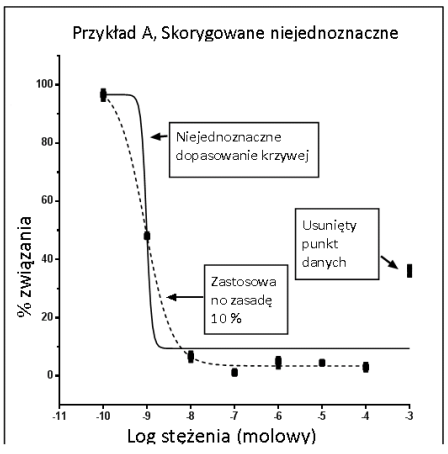
Analiza danych dotycząca badanych substancji chemicznych

3. Dane dotyczące wszystkich badanych substancji chemicznych należy analizować na zasadzie stopniowego podejścia, aby zapewnić odpowiednią analizę danych i właściwą klasyfikację każdej krzywej wiązania konkurencyjnego. Każdą serię badawczą w odniesieniu do badanej substancji chemicznej należy wstępnie poddać znormalizowanej analizie danych, która jest identyczna z analizą stosowaną w przypadku kontroli estrogenu odniesienia i substancji słabo wiążącej. Po zakończeniu należy przeprowadzić przegląd techniczny parametrów dopasowania krzywej, jak również wizualny przegląd stopnia, w jakim dane pasują do wygenerowanej krzywej wiązania konkurencyjnego dla każdej serii badawczej. W trakcie tego przeglądu technicznego obserwacje zależnego od stężenia spadku w procentach związanego specyficznie [^{3}H]-17β-estradiolu, małej zmienności pomiędzy kontrpróbami technicznymi przy każdym stężeniu chemicznym oraz spójności parametrów dopasowania pomiędzy trzema seriami badawczymi stanowią dobrą wskazówkę, że test i analizy danych zostały wykonane prawidłowo. Dokonując przeglądu wyników z każdej serii badawczej w przypadku badanej substancji chemicznej, należy przyjąć profesjonalny osąd, a dane wykorzystane do zaklasyfikowania poszczególnych badanych substancji chemicznych jako wiążące lub niewiążące powinny być uzasadnione i poparte naukowo.

4. W niektórych przypadkach, dane mogą wymagać większej uwagi w celu właściwego przeanalizowania i zinterpretowania danych dotyczących wiązań hrER. W poprzednich badaniach odnotowano przypadki, w których analiza i interpretacja danych dotyczących konkurencyjnego wiązania receptorów może być utrudniona przez wzrost odsetka wiązania specyficznego podczas badania substancji chemicznych w najwyższym stężeniu (rysunek 2). Ten problem jest dobrze znany i spotykano się z nim podczas stosowania protokołów dotyczących szeregu testów konkurencyjnych wiązań receptorowych (3). W takich sytuacjach przy niższych stężeniach odnotowuje się reakcję zależną od stężenia, ale wraz ze zbliżaniem się stężenia badanej substancji chemicznej do granicy rozpuszczalności, przemieszczenie [^{3}H]17β-estradiolu przestaje się zmniejszać. W takich przypadkach z danych dotyczących wysokich stężeń wynika, że osiągnięto biologiczną granicę testu. Często na przykład wiąże się to zjawisko z nierozpuszczalnością i strąceniem danej substancji chemicznej przy wysokich stężeniach, lub może ono wynikać z przekroczenia zdolności węgla drzewnego pokrytego dekstranem do zbierania niezwiązanego ligandu znakowanego izotopem w trakcie procedury oddzielania przy najwyższych stężeniach substancji chemicznych. Pozostawienie takich punktów danych podczas dopasowywania danych dotyczących wiązań konkurencyjnych do krzywej sigmoidalnej może czasem prowadzić do nieprawidłowej klasyfikacji potencjału wiązania receptora estrogenowego w odniesieniu do badanej substancji chemicznej (rysunek 2). Aby uniknąć takiej sytuacji, protokół testów wiązania hrER Freybergera–Wilsona i CERI obejmuje możliwość wykluczenia z analiz punktów danych, w przypadku których średnia kontrprób w odniesieniu do odsetka określonego wiązania [^{3}H]17β-estradiolu wynosi 10 % lub więcej powyżej średniej wartości zaobserwowanej przy niższym stężeniu (tj. zazwyczaj określa się to jako zasadę 10 %). Zasadę tę można zastosować tylko raz w odniesieniu do danej krzywej i muszą pozostać dane dotyczące co najmniej 6 stężeń, aby można było poprawnie sklasyfikować krzywą.

Rysunek 2

Przykłady, krzywe wiązania konkurencyjnego z wykorzystaniem lub bez wykorzystania zasady 10 %

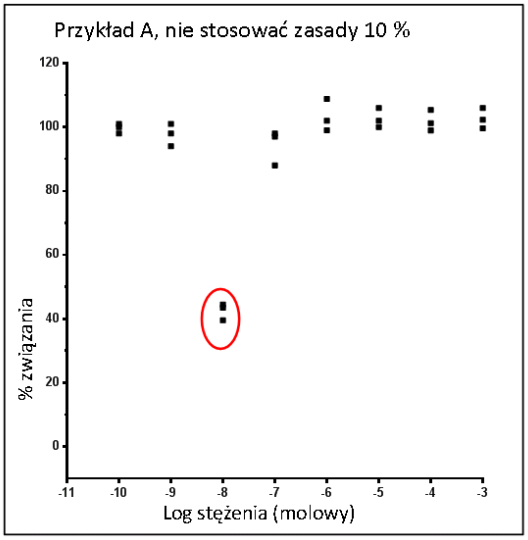


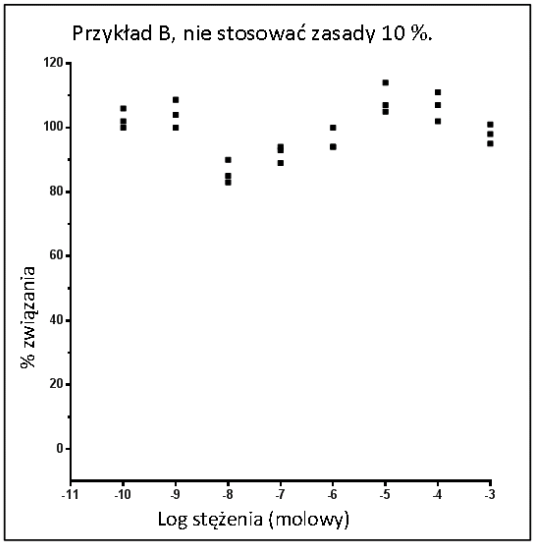
▼**M8**

5. Należy dokładnie rozważyć zastosowanie zasady 10 % do korekty tych krzywych i stosować ją tylko w przypadkach, w których istnieją wiele wskazuje na substancje wiążącą hrER. Podczas przeprowadzania doświadczeń na użytek badania walidacyjnego testu wiązania hrER Freybergera–Wilsona odnotowano, że zastosowanie zasady 10 % miało czasem niezamierzone i nieprzewidziane konsekwencje. Substancje chemiczne, które nie wchodziły w interakcję z receptorem (tj. rzeczywiste substancje inna niż substancje wiążąca) często odznaczały się zmiennością około 100 % wiązania radioligandu większą niż 10 % w całym zakresie badanych stężeń. Jeżeli najniższą wartość odnotowano przy niskim stężeniu, istnieje możliwość, że dane dotyczące wszystkich wyższych stężeń zostaną usunięte z analizy w wyniku zastosowania zasady 10 %, mimo że stężenia te mogłyby być przydatne do ustalenia, że dana substancja chemiczna to substancja inna niż substancja wiążąca. Na rysunku 3 przedstawiono przykłady, w których nie należy stosować zasady 10 %.

Rysunek 3

Przykłady, dane dotyczące wiązania konkurencyjnego, w przypadku których nie należy stosować zasady 10 %





▼**M8**

Źródła

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)* [W:] Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 226. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(2) Motulsky H. i Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. San Diego, Kalifornia: GraphPad Software Inc., s. 187–191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) SC Laws, S Yavanhxay, RL Cooper i JC Eldridge (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. „Toxicological. Sci.”nr 94(1), s. 46–56.

▼M8

B.71 **TESTY DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO* DOTYCZĄCE KLUCZOWEGO ZDARZENIA AKTYWACJI KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH W MECHANIZMIE WYWOŁYWANIA SKUTKÓW SZKODLIWYCH W ZAKRESIE DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ**

WPROWADZENIE OGÓLNE

Metoda badawcza oparta na kluczowym zdarzeniu aktywacji komórek dendrytycznych

1. Substancja działająca uczulająco na skórę oznacza substancję, która wywołuje reakcję alergiczną w następstwie kontaktu ze skórą, zgodnie z definicją określoną przez Globalny Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów ONZ (ONZ GHS) (1) oraz w rozporządzeniu Unii Europejskiej (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP) ([1]). Panuje ogólna zgoda co do kluczowych zdarzeń biologicznych stanowiących podstawę działania uczulającego na skórę. Istniejącą wiedzę dotyczącą mechanizmów chemicznych i biologicznych powiązanych z działaniem uczulającym na skórę podsumowano w formie mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych w ramach programu OECD dotyczącego mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych (2), począwszy od molekularnego zdarzenia inicjującego poprzez zdarzenia pośrednie aż do skutku szkodliwego, tj. alergicznego kontaktowego zapalenia skóry. Na przykład molekularnym zdarzeniem inicjującym (tj. pierwszym kluczowym zdarzeniem) jest wiązanie kowalencyjne substancji elektrofilowych z centrami nukleofilowymi w białkach skóry. Drugie kluczowe zdarzenie w tym mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych następuje w keratynocytach i obejmuje reakcje zapalne oraz zmiany w ekspresji genów powiązane ze specyficznymi mechanizmami sygnalizacji komórkowej, takimi jak mechanizmy zależne od elementu odpowiedzi antyoksydacyjnej/elektrofilowej (ARE). Trzecim kluczowym zdarzeniem jest aktywacja komórek dendrytycznych, na ogół oceniana na podstawie ekspresji specyficznych markerów powierzchniowych komórki, chemokinów i cytokinów. Czwartym kluczowym zdarzeniem jest aktywacja i proliferacja limfocytów T, która jest oceniana pośrednio w ramach testu lokalnych węzłów chłonnych przeprowadzonego na myszach (LLNA) (3).

2. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 442E (2017). Opisano w niej testy *in vitro*, które dotyczą mechanizmów opisanych na podstawie kluczowego zdarzenia aktywacji komórek dendrytycznych w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę (2). Metoda badawcza uwzględnia badania, które należy stosować do wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania zgodnie z GHS ONZ i rozporządzeniem CLP.

   W niniejszej metodzie badawczej opisano następujące badania:

   — badanie aktywacji ludzkich linii komórkowych (h-CLAT);

   — badanie aktywacji linii komórkowej U937 (U-SENS™)

   — test genu reporterowego Interleukiny 8 (test IL-8 Luc).

3. Badania uwzględnione w niniejszej metodzie badawczej i odpowiedniej wytycznej OECD dotyczącej badań mogą różnić się w zależności od procedury wykorzystywanej do generowania danych i odczytów pomiarów, lecz mogą być stosowane bez rozróżnienia na potrzeby spełnienia wymogów poszczególnych państw w zakresie wyników badań nad kluczowym zdarzeniem aktywacji komórek dendrytycznych w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, przy jednoczesnym wykorzystaniu wzajemnej akceptacji danych OECD.

([1]) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

▼M8

Kontekst i zasady badań prowadzonych z wykorzystaniem metody badawczej opartej na kluczowym zdarzeniu

4. Ocena działania uczulającego na skórę obejmuje na ogół wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych. W przypadku klasycznych metod, w których wykorzystuje się świnki morskie, tj. testu maksymalizacji na świnkach morskich (Magnussona-Kligmana) (test GPMT) oraz testu Buehlera (metody badawczej B.6) (4), ocenia się zarówno fazę indukcyjną, jak i fazy wywołania działania uczulającego na skórę. Przeprowadzany na myszach test lokalnych węzłów chłonnych (LLNA) (metoda badawcza B.42) (3) oraz jego dwie nieradioaktywne modyfikacje, LLNA: DA (metoda badawcza B.50) (5) i LLNA: BrdU-ELISA (metoda badawcza B.51) (6), w ramach których ocenia się wyłącznie reakcję indukcyjną, także zyskały akceptację, ponieważ zapewniają one przewagę nad testami prowadzonymi na świnkach morskich pod względem dobrostanu zwierząt i obiektywnego pomiaru fazy indukcyjnej działania uczulającego na skórę.

5. Niedawno przyjęto, oparte na analizie mechanistycznej, metody badawcze *in chemico* i *in vitro* dotyczące pierwszego kluczowego zdarzenia (metoda badawcza B.59; bezpośrednie oznaczanie reaktywności peptydów (7)) i drugiego kluczowego zdarzenia (metoda badawcza B.60; metoda badawcza z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2 (8)) w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę jako metody ułatwiające ocenę zagrożenia działaniem uczulającym na skórę substancji chemicznych.

6. Badania opisane w niniejszej metodzie badawczej pozwalają określić ilościowo zmianę ekspresji markera powierzchniowego (markerów powierzchniowych) komórki związanego z procesem aktywacji monocytów i komórek dendrytycznych po narażeniu na działanie czynników uczulających (np. CD54, CD86) albo zmiany ekspresji IL-8 – cytokiny związanej z aktywacją komórek dendrytycznych. Zgłoszono, że substancje działające uczulająco na skórę wywołują ekspresję markerów błony komórkowej, takich jak CD40, CD54, CD80, CD83 i CD86 dodatkowo oprócz indukcji prozapalnych cytokin, takich jak IL-1β i TNF-α, i szeregu chemokinów, takich jak IL-8 (CXCL8) i CCL3 (9)(10)(11)(12), związanych z aktywacją komórek dendrytycznych (2).

7. Ponieważ aktywacja komórek dendrytycznych stanowi jednak tylko jedno kluczowe zdarzenie inicjujące mechanizm wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę (2)(13), informacje wygenerowane przy użyciu samych tylko markerów badań aktywacji komórek dendrytycznych mogą nie być wystarczające do tego, aby stwierdzić występowanie lub brak występowania potencjalnego działania uczulającego na skórę substancji chemicznych. Dlatego też proponuje się, aby dane wygenerowane przy zastosowaniu testów opisanych w niniejszej metodzie badawczej stosować do wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę (tj. należących do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania w przypadku ich wykorzystania w ramach zintegrowanych podejść do badań i oceny (IATA), wraz z innymi istotnymi informacjami uzupełniającymi, np. pochodzącymi z testów *in vitro*, odnoszącymi się do innych kluczowych zdarzeń inicjujących mechanizm wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, jak również pochodzącymi z metod niebadawczych, w tym danych z podejść przekrojowych z zastosowaniem analogicznych substancji chemicznych (13). Przykłady wykorzystania danych wygenerowanych w tych badaniach w ramach zdefiniowanego podejścia, tj. podejścia ujednoliconego zarówno pod kątem zbioru wykorzystywanych źródeł informacji, jak i procedury stosowanej w odniesieniu do danych w celu uzyskania prognoz, zostały opublikowane (13) i mogą zostać wykorzystane jako użyteczne elementy w ramach IATA.

8. Badań opisanych w niniejszej metodzie badawczej nie można stosować samodzielnie w celu dalszego klasyfikowania substancji działających uczulająco na skórę do podkategorii 1A i 1B, zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP przez organy realizujące podział na te dwie kategorie, ani w celu przewidzenia ich siły działania na potrzeby podjęcia decyzji dotyczących oceny bezpieczeństwa. Jednakże w zależności od ram regulacyjnych do zaklasyfikowania substancji chemicznej do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP można wykorzystać same wyniki dodatnie wygenerowane przy zastosowaniu tych metod.

▼M8

9. Termin „badana substancja chemiczna” jest używany w niniejszej metodzie badawczej w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania ([1]) i nie jest powiązany z możliwością zastosowania badań do badania substancji jednoskładnikowych, substancji wieloskładnikowych lub mieszanin. Aktualnie dostępne są ograniczone informacje na temat możliwości zastosowania badań do substancji wieloskładnikowych / mieszanin (14)(15). Z technicznego punktu widzenia badania mogą jednak mieć zastosowanie do badania zarówno substancji wieloskładnikowych, jak i mieszanin. Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy jednak zastanowić się nad tym, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego ([2]). Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny. Ponadto podczas badania substancji wieloskładnikowych lub mieszanin należy rozważyć możliwe zakłócenie obserwowanych reakcji przez składniki cytotoksyczne.

BIBLIOGRAFIA

(1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2015). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). wydanie szóste zmienione, Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostępne na stronie internetowej: 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. Seria dotycząca badań i oceny nr 168. Dostępne na stronie internetowej: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En)

(3) Rozdział B.42 niniejszego załącznika: Badanie lokalnych węzłów chłonnych.

(4) Rozdział B.6 niniejszego załącznika: Sensybilizacja skóry.

(5) Rozdział B.50 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: badanie lokalnych węzłów chłonnych DA.

(6) Rozdział B.51 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: badanie lokalnych węzłów chłonnych BrdU-ELISA.

(7) Rozdział B.59 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę in chemico: Bezpośrednie oznaczanie reaktywności peptydów (DPRA).

(8) Rozdział B.60 niniejszego załącznika: Badanie działania uczulającego na skórę *in vitro*: metoda badawcza z wykorzystaniem lucyferazy 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 i 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 i 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]) W czerwcu 2013 r. na posiedzeniu wspólnym OECD uzgodniono, że – w przypadkach, w których będzie to możliwe – w nowych, zaktualizowanych wytycznych dotyczących badań należy bardziej konsekwentnie stosować termin „badana substancja chemiczna” w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania.

([2]) To zdanie zaproponowano i uzgodniono podczas posiedzenia grupy roboczej krajowych koordynatorów programu wytycznych dotyczących badań w kwietniu 2014 r.

▼**M8**

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y i 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). Sria dotycząca badań i oceny nr 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, załącznik 1 i załącznik 2. ENV/JM/HA(2016)29. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: 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**

Dodatek 1

BADANIE DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ IN VITRO: BADANIE AKTYWACJI LUDZKICH LINII KOMÓRKOWYCH (H-CLAT)

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

1. Badanie h-CLAT pozwala określić ilościowo zmianę ekspresji markerów powierzchniowych komórek związanych z procesem aktywacji monocytów i komórek dendrytycznych (tj. CD86 i CD54) w ludzkiej białaczkowej linii monocytarnej THP-1 po narażeniu na działanie czynników uczulających (1)(2). Pomiary poziomów ekspresji markerów powierzchniowych komórek CD86 i CD54 wykorzystuje się później do wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania.

2. Badanie h-CLAT oceniono w ramach badania walidacyjnego koordynowanego przez laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach (EURL ECVAM) i późniejszej niezależnej wzajemnej oceny przeprowadzonej przez Naukowy Komitet Doradczy EURL ECVAM (ESAC). Uwzględniając wszystkie dostępne dowody i wkład ze strony organów regulacyjnych i zainteresowanych stron, EURL ECVAM (3) zaleciło stosowanie badania h-CLAT w ramach IATA do wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco i substancji niewykazujących takiego działania na potrzeby klasyfikacji i oznakowania pod względem zagrożeń. Przykłady wykorzystania danych z badania h-CLAT w połączeniu z innymi informacjami są opisane w literaturze (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

3. Udowodniono, że badanie h-CLAT można przeprowadzać również w laboratoriach posiadających doświadczenie w zakresie technik związanych z kulturą komórkową i analizą przy użyciu cytometrii przepływowej. Poziom odtwarzalności prognoz, którego można oczekiwać od tego badania, ma wartość rzędu 80 % wewnątrz laboratoriów i pomiędzy nimi (3)(12). Wyniki uzyskane w badaniu walidacyjnym (13) i innych opublikowanych badaniach (14) ogólnie wskazują na to, że – w porównaniu z wynikami LLNA – dokładność rozróżniania substancji działających uczulająco na skórę (tj. należących do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania wynosi 85 % (N = 142) przy czułości na poziomie 93 % (94/101) oraz swoistości na poziomie 66 % (27/41) (na podstawie ponownej analizy wykonanej przez EURL ECVAM (12) przy uwzględnieniu wszystkich istniejących danych, ale nie uwzględniając ujemnych wyników substancji chemicznych, których log K_{ow} wynosi powyżej 3,5 zgodnie z opisem z pkt 4). Prawdopodobieństwo wystąpienia prognoz fałszywie ujemnych przy zastosowaniu metody h-CLAT jest większe w przypadku substancji chemicznych wykazujących niską lub średnią siłę działania uczulającego na skórę (tj. należących do podkategorii 1B wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) niż w przypadku substancji wykazujących wysoką siłę działania uczulającego na skórę (tj. należących do podkategorii 1A wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) (4)(13)(15). Wszystkie te informacje łącznie wskazują na użyteczność metody h-CLAT w identyfikowaniu zagrożeń związanych z działaniem uczulającym na skórę. Przedstawione tutaj wartości dokładności h-CLAT jako samodzielnego badania są jednak wyłącznie orientacyjne, ponieważ badanie to należy rozpatrywać w połączeniu z innymi źródłami informacji w kontekście IATA i zgodnie z przepisami pkt 7 i 8 wprowadzenia ogólnego. Co więcej, przy ocenie metod niewymagających wykorzystania zwierząt pod kątem działania uczulającego na skórę należy pamiętać, że LLNA, jak również inne badania przeprowadzane na zwierzętach, mogą nie w pełni odzwierciedlać sytuację w odniesieniu do ludzi.

4. Na podstawie obecnie dostępnych danych wykazano, że metoda h-CLAT ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych obejmujących szereg organicznych grup funkcyjnych, mechanizmów reagowania, sił działania uczulającego na skórę (jak określono w badaniach *in vivo*) oraz właściwości fizykochemicznych (3)(14)(15). Metoda h-CLAT ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych, które są rozpuszczalne lub tworzą stabilną dyspersję (tj. koloid lub zawiesinę, w których badana substancja chemiczna nie osadza się ani nie oddziela od rozpuszczalnika/nośnika w różne fazy) w odpowiednim rozpuszczalniku/nośniku (zob. pkt 14). Badane substancje chemiczne o log K_{ow} powyżej 3,5 mają tendencję do generowania wyników fałszywie ujemnych (14). Dlatego nie powinno się uwzględniać wyników ujemnych badanych substancji chemicznych, których log K_{ow} jest wyższy od 3,5. Wyniki dodatnie badanych substancji chemicznych, których log K_{ow} jest wyższy od 3,5, można jednak dalej wykorzystywać do wsparcia

▼M8

identyfikacji badanej substancji chemicznej jako substancji działającej uczulająco na skórę. Ponadto z powodu ograniczonej wydolności metabolicznej zastosowanych linii komórkowych (16) oraz warunków doświadczalnych prohapteny (tj. substancje wymagające aktywacji enzymatycznej np. przez enzymy P450) oraz prehapteny (tj. substancje aktywowane przez utlenianie), w szczególności te o niskim tempie utleniania, również mogą dawać wyniki ujemne w h-CLAT (15). Fluorescencyjne badane substancje chemiczne można ocenić za pomocą badania h-CLAT (17), jednak badane substancje chemiczne o wysokiej fluorescencji emitujące fale tej samej długości co izotiocyjanian fluoresceiny (FITC) lub jodek propidyny będą zakłócać detekcję przy użyciu cytometrii przepływowej, co uniemożliwia ich prawidłową ocenę z wykorzystaniem przeciwciał skoniugowanych z FITC lub jodku propidyny. W takim przypadku można użyć odpowiednio innych przeciwciał znakowanych fluorochromem lub innych markerów cytotoksyczności, o ile można wykazać, że pozwalają one uzyskać wyniki podobne do wyników otrzymywanych w przypadku przeciwciał znakowanych FITC (zob. pkt 24) lub jodku propidyny (zob. pkt 18), np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 1–2. W świetle powyższego wyniki ujemne należy interpretować w kontekście zdefiniowanych ograniczeń i w połączeniu z innymi źródłami informacji w ramach IATA. W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania metody h-CLAT w odniesieniu do innych konkretnych kategorii badanych substancji chemicznych, nie należy jej stosować w odniesieniu do tych konkretnych kategorii.

5. Jak opisano powyżej, metoda h-CLAT wspiera rozróżnienie substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania. Może ona jednak również potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania uczulającego (4)(5)(9), gdy stosuje się ją w ramach podejść zintegrowanych takich jak IATA. Wymagane jest jednak przeprowadzenie dalszych prac, najlepiej na podstawie danych dotyczących ludzi, aby ustalić, w jaki sposób wyniki badania h-CLAT mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania.

6. Definicje znajdują się w dodatku 1.1.

ZASADA BADANIA

7. Metoda h-CLAT jest testem *in vitro*, który pozwala określić ilościowo zmiany ekspresji markera powierzchniowego komórki (tj. CD86 i CD54) w ludzkiej linii komórkowej białaczki monocytarnej, tj. komórkach THP-1, po 24 godzinach narażenia na działanie badanej substancji chemicznej. Te cząsteczki powierzchniowe są typowymi markerami aktywacji monocytarnej THP-1 i mogą imitować aktywację komórek dendrytycznych, która odgrywa kluczową rolę w uczulaniu limfocytów T. Zmiany ekspresji markera powierzchniowego mierzy się za pomocą cytometrii przepływowej po wybarwieniu komórek przeciwciałami znakowanymi fluorochromem. Jednocześnie przeprowadza się również pomiar cytotoksyczności, aby ocenić, czy podwyższona ekspresja markera powierzchniowego zachodzi przy stężeniach niższych niż stężenia cytotoksyczne. Względną intensywność fluorescencji markerów powierzchniowych w porównaniu z kontrolą z rozpuszczalnikiem/nośnikiem wylicza się i wykorzystuje w modelu prognozowania (zob. pkt 26), aby wesprzeć rozróżnienie substancji działających uczulająco i substancji niewykazujących takiego działania.

WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

8. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania opisanego w niniejszym dodatku do metody badawczej B.71 laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną z zastosowaniem dziesięciu substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 1.2. Ponadto użytkownicy badania powinni prowadzić bazę danych historycznych wygenerowanych podczas kontroli reaktywności (zob. pkt 11) oraz kontroli dodatnich i kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem (zob. pkt 20–22), a także wykorzystywać te dane do potwierdzenia zachowania odtwarzalności badania w swoim laboratorium w miarę upływu czasu.

▼M8

PROCEDURA

9. Podstawę niniejszego badania stanowi protokół nr 158 bazy danych na temat metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach (DB-ALM) dotyczący h-CLAT (18), który reprezentuje protokół wykorzystany w badaniu walidacyjnym koordynowanym przez EURL ECVAM. Zaleca się, aby ten protokół był stosowany przy wdrażaniu i stosowaniu metody h-CLAT w laboratorium. Poniżej opisano główne elementy i procedury metody h-CLAT, które składają się z dwóch kroków: *testu ustalającego dawkę* i *pomiaru ekspresji CD86/CD54*.

Przygotowanie komórek

10. Do badania metodą h-CLAT należy wykorzystać ludzką białaczkową linię monocytarną THP-1. Zaleca się pozyskiwanie komórek (TIB-202™) z banku komórek posiadającego niezbędne uprawnienia, takiego jak np. zbiór kultur typu amerykańskiego.

11. Komórki THP-1 hoduje się w temperaturze 37°C, w obecności 5 % CO_2 i w wilgotnym środowisku, w podłożu RPMI-1640 z dodatkiem 10 % bydlęcej surowicy płodowej, 0,05 mM 2-merkaptoetanolu, 100 jednostek/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny. Można zrezygnować z użycia penicyliny i streptomycyny w podłożu. W takim przypadku użytkownicy powinni jednak zweryfikować, czy brak antybiotyku w podłożu nie będzie miał wpływu na wyniki, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 1.2. W każdym przypadku, aby zminimalizować ryzyko zanieczyszczenia, należy przestrzegać dobrych praktyk w zakresie kultury komórkowej, niezależnie od tego, czy w podłożu do hodowli kultury komórkowej znajdują się antybiotyki, czy też nie. Komórki THP-1 wysiewa się regularnie co 2–3 dni w gęstości od 0,1 do $0{,}2 \times 10^6$ komórek/ml. Powinny one być utrzymywane w gęstości od 0,1 do $1{,}0 \times 10^6$ komórek/ml. Przed wykorzystaniem komórek do badań należy je zakwalifikować, przeprowadzając kontrolę reaktywności. Kontrolę reaktywności komórek należy przeprowadzić, wykorzystując do tego celu kontrole dodatnie, tj. 2,4-dinitrochlorobenzen (DNCB) (nr CAS 97-00-7, czystość ≥ 99 %) i siarczan niklu ($NiSO_4$) (nr CAS 10101-97-0, czystość ≥ 99 %), oraz kontrolę ujemną, tj. kwas mlekowy (nr CAS 50-21-5, czystość ≥ 85 %), dwa tygodnie po rozmrożeniu. Zarówno 2,4-dinitrochlorobenzen, jak i $NiSO_4$ powinny wywołać reakcję dodatnią markera powierzchniowego komórki CD86, jak również CD54, a kwas mlekowy powinien wywołać reakcję ujemną markera powierzchniowego komórki CD86, jak również CD54. W teście należy wykorzystać wyłącznie te komórki, które pomyślnie przeszły kontrolę reaktywności. Komórki można rozmnażać do dwóch miesięcy po rozmrożeniu. Liczba pasaży nie powinna przekraczać 30. Kontrolę reaktywności należy przeprowadzić zgodnie z procedurami opisanymi w pkt 20–24.

12. Komórki THP-1 wysiewa się do badań w gęstości $0{,}1 \times 10^6$ komórek/ml albo $0{,}2 \times 10^6$ komórek/ml i dokonuje ich wstępnej hodowli w kolbach z kulturami przez odpowiednio 72 godziny lub 48 godzin. Ważne jest, aby zagęszczenie komórek w kolbie z kulturami tuż po okresie hodowli wstępnej było jak najbardziej spójne w każdym z doświadczeń (stosując jeden z dwóch wyżej wymienionych warunków wstępnej hodowli kultur), ponieważ zagęszczenie komórek w kolbie z kulturami tuż po okresie hodowli wstępnej mogłoby wpłynąć na ekspresję CD86/CD54 wywołaną przez alergeny (19). W dniu badania komórki pobrane z kolby z kulturami zawiesza się ponownie w świeżym podłożu w gęstości 2×10^6 komórek/ml. Następnie komórki umieszcza się w dołkach 24-dołkowej płytki płaskodennej (500 µl, 1×10^6 komórek/dołek) lub w dołkach 96-dołkowej płytki płaskodennej (80 µl, $1{,}6 \times 10^5$ komórek/dołek).

Test ustalający dawkę

13. *Test ustalający dawkę* przeprowadza się, aby określić CV75, czyli stężenie badanej substancji chemicznej, dzięki któremu żywotność komórek (CV) wynosi 75 % w porównaniu z kontrolą z rozpuszczalnikiem/nośnikiem. Wartość CV75 wykorzystuje się do określenia stężenia badanych substancji chemicznych dla pomiaru ekspresji *CD86/CD54* (zob. pkt 20–24).

▼M8

Przygotowanie badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych

14. Badane substancje chemiczne oraz substancje kontrolne przygotowuje się w dniu badania. W metodzie h-CLAT badane substancje chemiczne są rozpuszczane lub tworzą stabilne dyspersje (zob. również pkt 4) w soli fizjologicznej lub podłożu (pierwsze warianty rozpuszczalnika/nośnika) lub w sulfotlenku dimetylu (DMSO, czystość ≥ 99 %) (drugi wariant rozpuszczalnika/nośnika), jeżeli badana substancja chemiczna nie jest rozpuszczalna lub nie tworzy stabilnej dyspersji w dwóch rozpuszczalnikach/nośnikach wymienionych jako pierwsze, do stężeń końcowych wynoszących 100 mg/ml (soli fizjologicznej lub podłoża) lub 500 mg/ml (sulfotlenku dimetylu). Można użyć innych rozpuszczalników/nośników niż te opisane powyżej pod warunkiem przedstawienia wystarczającego uzasadnienia naukowego. Należy uwzględnić stabilność badanej substancji chemicznej w końcowym rozpuszczalniku/nośniku.

15. Na początku przygotowuje się roztwory podstawowe badanych substancji chemicznych o stężeniach wynoszących 100 mg/ml (w soli fizjologicznej lub podłożu) lub 500 mg/ml (w sulfotlenku dimetylu), a następnie rozcieńcza zgodnie z następującymi krokami:

— jeżeli rozpuszczalnikiem/nośnikiem jest sól fizjologiczna lub podłoże: przygotowuje się osiem roztworów podstawowych (osiem stężeń) przez dwukrotne rozcieńczenie w postępie geometrycznym przy użyciu odpowiedniego rozpuszczalnika/nośnika. Następnie otrzymane roztwory podstawowe rozcieńcza się 50-krotnie w podłożu (roztwory robocze). W przypadku gdy najwyższe stężenie końcowe na płytce wynoszące 1 000 µg/ml nie jest toksyczne, najwyższe stężenie należy wyznaczyć ponownie poprzez przeprowadzenie nowego badania cytotoksyczności. Końcowe stężenie na płytce nie powinno przekraczać 5 000 µg/ml dla badanych substancji chemicznych, które zostały rozpuszczone w soli fizjologicznej lub podłożu lub utworzyły w nich stabilną dyspersję;

— jeżeli rozpuszczalnikiem/nośnikiem jest sulfotlenek dimetylu: przygotowuje się osiem roztworów podstawowych (osiem stężeń) przez dwukrotne rozcieńczenie w postępie geometrycznym przy użyciu odpowiedniego rozpuszczalnika/nośnika. Następnie otrzymane roztwory podstawowe rozcieńcza się 250-krotnie w podłożu (roztwory robocze). Końcowe stężenie na płytce nie powinno przekraczać 1 000 µg/ml, nawet jeżeli stężenie to nie jest toksyczne.

Roztwory robocze ostatecznie wykorzystuje się do narażenia na działanie substancji chemicznej poprzez dodanie do zawiesiny komórkowej THP-1 na płytce (zob. również pkt 17) roztworu roboczego w objętości równej objętości tej zawiesiny, aby osiągnąć dodatkowe dwukrotne rozcieńczenie (zazwyczaj końcowy zakres stężeń na płytce wynosi 7,81–1 000 µg/ml).

16. W ramach kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem w metodzie h-CLAT stosuje się podłoże (w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczonych w podłożu albo soli fizjologicznej lub tworzących w nich stabilną dyspersję (zob. pkt 4)) lub w sulfotlenek dimetylu (w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczonych w sulfotlenku dimetylu lub tworzących w nim stabilną dyspersję) badane w pojedynczym stężeniu końcowym na płytce wynoszącym 0,2 %. Podlega takiemu samemu rozcieńczeniu jakie opisano dla roztworów roboczych w pkt 15.

Podawanie badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych

17. Podłoże lub roztwory robocze opisane w pkt 15 i 16 miesza się w stosunku 1:1 (obj.) z zawiesinami komórkowymi przygotowanymi w 24-dołkowej lub 96-dołkowej płytce płaskodennej (zob. pkt 12). Płytki poddane powyższym procesom następnie inkubuje się przez 24 ± 0,5 godziny w temperaturze 37°C w obecności 5 % CO_2. Należy dołożyć starań, aby nie dopuścić do odparowania lotnych badanych substancji chemicznych i aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu między dołkami przez badane substancje chemiczne, np. szczelnie zaklejając płytkę przed rozpoczęciem inkubacji z wykorzystaniem badanych substancji chemicznych (20).

▼M8

Barwienie jodkiem propidyny

18. Po upływie 24 godzin ±0,5 godziny narażenia komórki przenosi się do probówki i zbiera poprzez odwirowanie. Supernatanty odrzuca się, a pozostałe komórki zawiesza się ponownie w 200 µl (w przypadku płytki 96-dołkowej) lub 600 µl (w przypadku płytki 24-dołkowej) roztworu chlorku sodu buforowanego fosforanami zawierającego 0,1 % albuminy surowicy bydlęcej (roztwór buforowy do wybarwiania). 200 µl zawiesiny komórkowej przenosi się do dołków 96-dołkowej płytki okrągłodennej (w przypadku płytki 96-dołkowej) lub probówki Eppendorfa (w przypadku płytki 24-dołkowej) i dwukrotnie przemywa się w 200 µl (w przypadku płytki 96-dołkowej) lub 600 µl (w przypadku płytki 24-dołkowej) roztworu buforowego do wybarwiania. Później komórki zawiesza się ponownie w roztworze buforowym do wybarwiania (np. w 400 µl) i dodaje roztwór jodku propidyny (np. 20 µl) (przykładowe stężenie końcowe jodku propidyny wynosi 0,625 µg/ml). Można wykorzystać inne markery cytotoksyczności, takie jak 7-aminoaktynomycyna D (7-AAD), błękit trypanu lub innego rodzaju markery, jeżeli można wykazać, że alternatywne barwniki pozwalają uzyskać wyniki podobne do wyników otrzymywanych w przypadku wykorzystania jodku propidyny, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 1.2.

Pomiar cytotoksyczności z wykorzystaniem cytometrii przepływowej i oszacowanie wartości CV75

19. Wchłanianie jodku propidyny analizuje się za pomocą cytometrii przepływowej z kanałem akwizycji FL-3. Łącznie pozyskuje się 10 000 żywych komórek (nieoznaczonych jodkiem propidyny). Żywotność komórek można obliczyć za pomocą poniższego równania, korzystając z programu do analizy cytometrycznej. Przy niskiej żywotności komórek należy pozyskać do 30 000 komórek, wśród których znajdują się martwe komórki. Ewentualnie dane można pozyskać w ciągu jednej minuty od rozpoczęcia analizy.

$$\textit{Żywotność komórek} = \frac{\textit{Liczba żywych komórek}}{\textit{Łączna liczba pozyskanych komórek}} \times 100$$

Wartość CV75 (zob. pkt 13), tj. stężenie wykazujące przeżywalność komórek THP-1 na poziomie 75 % (cytotoksyczność na poziomie 25 %), oblicza się metodą interpolacji logarytmiczno-liniowej za pomocą następującego równania:

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

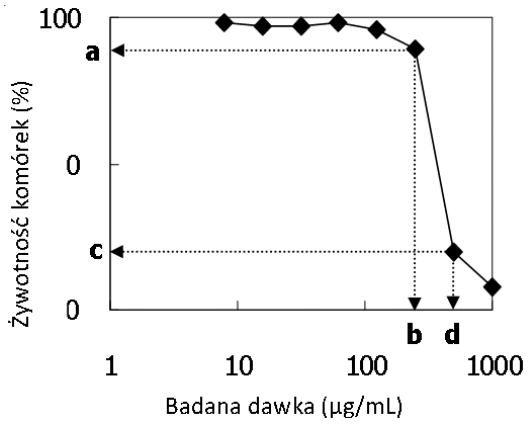
gdzie:

a oznacza minimalną wartość żywotności komórek powyżej 75 %;

c oznacza maksymalną wartość żywotności komórek poniżej 75 %;

b i d oznaczają stężenia, przy których wartość żywotności komórek wynosi odpowiednio a i c.

▼M8



Do określania CV75 można stosować inne podejścia pod warunkiem wykazania braku wpływu na wyniki (np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości).

Pomiar ekspresji CD86/CD54

Przygotowanie badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych

20. Odpowiedni rozpuszczalnik/nośnik (sól fizjologiczna, podłoże lub sulfotlenek dimetylu; zob. pkt 14) jest używany do rozpuszczania badanych substancji chemicznych lub tworzenia ich stabilnych zawiesin. Badane substancje chemiczne najpierw rozcieńcza się do stężenia odpowiadającego 100-krotności (w przypadku soli fizjologicznej lub podłoża) lub 500-krotności (w przypadku sulfotlenku dimetylu) 1,2 × CV75 określonego w *teście ustalającym dawkę* (zob. pkt 19). Jeżeli nie można określić wartości CV75 (tj. jeżeli w *teście ustalającym dawkę* nie można zaobserwować wystarczającej cytotoksyczności), jako stężenia początkowego należy użyć najwyższego rozpuszczalnego stężenia lub stężenia stabilnej zawiesiny badanej substancji chemicznej przygotowanej z użyciem każdego rozpuszczalnika/nośnika. Należy zwrócić uwagę, że końcowe stężenie na płytce nie powinno przekraczać 5 000 µg/ml (w przypadku soli fizjologicznej lub podłoża) lub 1 000 µg/ml (w przypadku sulfotlenku dimetylu). Następnie przy pomocy odpowiedniego rozpuszczalnika/nośnika sporządza się 1,2-krotne rozcieńczenia w postępie geometrycznym, aby uzyskać roztwory podstawowe (osiem stężeń wynoszących od 100 × 1,2 × CV75 do 100 × 0,335 × CV75 (w przypadku soli fizjologicznej lub podłoża) lub od 500 × 1,2 × CV75 do 500 × 0,335 × CV75 (w przypadku sulfotlenku dimetylu)), które zostaną poddane badaniu metodą h-CLAT (przykład schematu dawkowania można znaleźć w protokole DB-ALM nr 158). Następnie roztwory podstawowe rozcieńcza się 50-krotnie (w przypadku soli fizjologicznej lub podłoża) lub 250-krotnie (w przypadku sulfotlenku dimetylu) w podłożu (roztwory robocze). Te roztwory robocze ostatecznie wykorzystuje się do narażenia na działanie substancji chemicznej, stosując dodatkowy końcowy dwukrotny współczynnik rozcieńczenia na płytce. W przypadku gdy wyniki nie spełniają opisanych w pkt 29 i 30 kryteriów dopuszczalności dotyczących żywotności komórek, można powtórzyć *test ustalający dawkę*, aby wyznaczyć dokładniejszą wartość CV75. Należy zauważyć, że do pomiaru ekspresji CD86/CD54 użyte mogą być jedynie płytki 24-dołkowe.

21. Kontrolę z rozpuszczalnikiem/nośnikiem przygotowuje się w sposób opisany w pkt 16. 2,4-dinitrochlorobenzen jest stosowany jako kontrola dodatnia w metodzie h-CLAT (zob. pkt 11), w której roztwory podstawowe przygotowuje się w sulfotleneku dimetylu i rozcieńcza w taki sposób, jak opisano w pkt 20 dla roztworów podstawowych. 2,4-dinitrochlorobenzen należy stosować jako kontrolę dodatnią do *pomiaru ekspresji CD86/CD54* w końcowym, pojedynczym stężeniu na płytce (zwykle 4,0 µg/ml). Aby uzyskać na płytce stężenie 2,4-dinitrochlorobenzenu wynoszące 4,0 µg/ml, przygotowuje się roztwór podstawowy 2,4-dinitrochlorobenzenu w sulfotleneku

▼M8

dimetylu o stężeniu 2 mg/ml, a następnie rozcieńcza się go 250-krotnie w podłożu do roztworu roboczego o stężeniu 8 μg/ml. Ewentualnie jako stężenie kontroli dodatniej można użyć CV75 2,4-dinitrochlorobenzenu, które jest określane w każdej placówce badawczej. Można stosować inne odpowiednie kontrole dodatnie, jeżeli dostępne są dane historyczne pozwalające na uzyskanie porównywalnych kryteriów dopuszczalności analizy. W przypadku kontroli dodatnich końcowe pojedyncze stężenie na płytce nie powinno przekraczać 5 000 μg/ml (w przypadku soli fizjologicznej lub podłoża) lub 1 000 μg/ml (w przypadku sulfotlenku dimetylu). Kryteria dopuszczalności analizy są takie same jak kryteria opisane w odniesieniu do badanej substancji chemicznej (zob. pkt 29) z wyjątkiem ostatniego kryterium dopuszczalności, ponieważ kontrolę dodatnią bada się przy pojedynczym stężeniu.

Podawanie badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych

22. W odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej i substancji kontrolnej należy przeprowadzić jedno doświadczenie, aby uzyskać prognozę. Każde doświadczenie składa się co najmniej z dwóch niezależnych analiz *pomiaru ekspresji CD86/CD54* (zob. pkt 26–28). Każdą z niezależnych analiz przeprowadza się innego dnia lub tego samego dnia, pod warunkiem że na potrzeby każdej analizy: a) przygotowuje się niezależne, świeże roztwory podstawowe i robocze badanej substancji chemicznej oraz roztwory przeciwciał, a także b) używa się niezależnie zebranych komórek (tj. komórki zbiera się z innych kolb z kulturami); komórki mogą jednak pochodzić z tego samego pasażu. Badana substancja chemiczna i substancje kontrolne przygotowane jako roztwory robocze (500 μl) miesza się z 500 μl zawiesiny komórkowej (1×10^6 komórek) w stosunku 1:1, a komórki inkubuje się przez 24 ± 0,5 godziny, jak opisano w pkt 20 i 21. W każdej analizie wystarczające będzie przeprowadzenie jednej kontrpróby w odniesieniu do każdego stężenia badanej substancji chemicznej i substancji kontrolnej, ponieważ prognozę uzyskuje się z co najmniej dwóch niezależnych analiz.

Wybarwianie komórek i analiza

23. Po upływie 24 godzin ±0,5 godziny narażenia komórki są przenoszone z płytki 24-dołkowej do probówek, zbierane poprzez odwirowanie, a następnie dwukrotnie przemywane w 1 ml roztworu buforowego do wybarwiania (w razie potrzeby można wykonać dodatkowe kroki związane z przemywaniem). Po przemyciu komórki blokuje się w 600 μl roztworu blokującego (roztworu buforowego do wybarwiania zawierającego 0,01 % (w/v) globuliny (ludzka II, III frakcja Cohna; SIGMA, #G2388-10G lub równoważna)) i inkubuje w temperaturze 4°C przez 15 minut. Po zablokowaniu komórki dzieli się na trzy podwielokrotności po 180 μl i umieszcza się je w dołkach 96-dołkowej płytki okrągłodennej lub w probówce Eppendorfa.

24. Po odwirowaniu komórki wybarwia się za pomocą 50 μl przeciwciał anty-CD86, anty-CD54 lub mysich przeciwciał IgG1 (izotyp) znakowanych FITC w temperaturze 4°C przez 30 minut. Należy użyć przeciwciał opisanych w protokole nr 158 DB-ALM dotyczącym h-CLAT (18), rozcieńczając w stosunku objętościowym 3:25 (w przypadku CD86 (BD-PharMingen, #555657; klon: Fun-1)) lub w stosunku objętościowym 3:50 (w przypadku CD54 (DAKO, #F7143; klon: 6.5B5) i IgG1 (DAKO, #X0927)) w roztworze buforowym do wybarwiania. Naukowcy opracowujący opisywane badanie wskazali powyższe współczynniki rozcieńczenia przeciwciał jako dające najlepszy stosunek sygnału do szumu. Z doświadczenia naukowców opracowujących badanie wynika, że intensywność fluorescencji przeciwciał jest zwykle stała w różnych partiach. Użytkownicy mogą jednak rozważyć miareczkowanie przeciwciał w warunkach własnego laboratorium, aby określić stężenia, które są najbardziej stosowne dla danego zastosowania. Można wykorzystać inne przeciwciała anty-CD86 lub anty-CD54 znakowane fluorochromem, jeżeli można wykazać, że pozwalają one uzyskać wyniki podobne do wyników otrzymywanych w przypadku wykorzystania przeciwciał skoniugowanych z FITC, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 1.2. Należy zaznaczyć, że zmiana klona lub dostawcy przeciwciał opisanych w protokole nr 158 DB-ALM dotyczącym h-CLAT (18) może wpłynąć na wyniki. Po co najmniej dwukrotnym przemyciu komórek w 150 μl roztworu buforowego do wybarwiania zawiesza się je ponownie w roztworze buforowym

▼M8

do wybarwiania (np. w 400 µl) i dodaje się roztwór jodku propidyny (np. 20 µl, aby uzyskać stężenie końcowe wynoszące 0,625 µg/ml) lub roztwór innego markera cytotoksyczności (zob. pkt 18). Poziomy ekspresji CD86 i CD54 oraz żywotność komórek analizuje się przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena danych

25. Ekspresję markerów CD86 i CD54 analizuje się za pomocą cytometrii przepływowej z kanałem pomiarowym FL-1. Na podstawie średniej geometrycznej intensywności fluorescencji (MFI) oblicza względną intensywność fluorescencji (RFI) CD86 i CD54 w odniesieniu do komórek kontroli dodatniej i komórek poddanych działaniu substancji chemicznej, korzystając z poniższego równania:

$$RFI = \frac{\begin{array}{c}MFI\ komórki\ poddanej\ działaniu\ substancji\ chemicznej - \\ MFI\ komórek\ zkontroli\ izotypowych\ poddanych\ działaniu\ substancji\ chemicznej\end{array}}{\begin{array}{c}MFI\ komórek\ kontrolnych\ poddanych\ działaniu\ rozpuszczalnika/nośnika - \\ MFI\ komórek\ zkontroli\ izotypowych\ poddanych\ działaniu\ rozpuszczalnia/nośnika\end{array}} \times 100$$

Żywotność komórek kontroli izotypowej (które barwi się mysimi przeciwciałami IgG1 (izotyp)) również oblicza się zgodnie z równaniem opisanym w pkt 19.

Model prognozowania

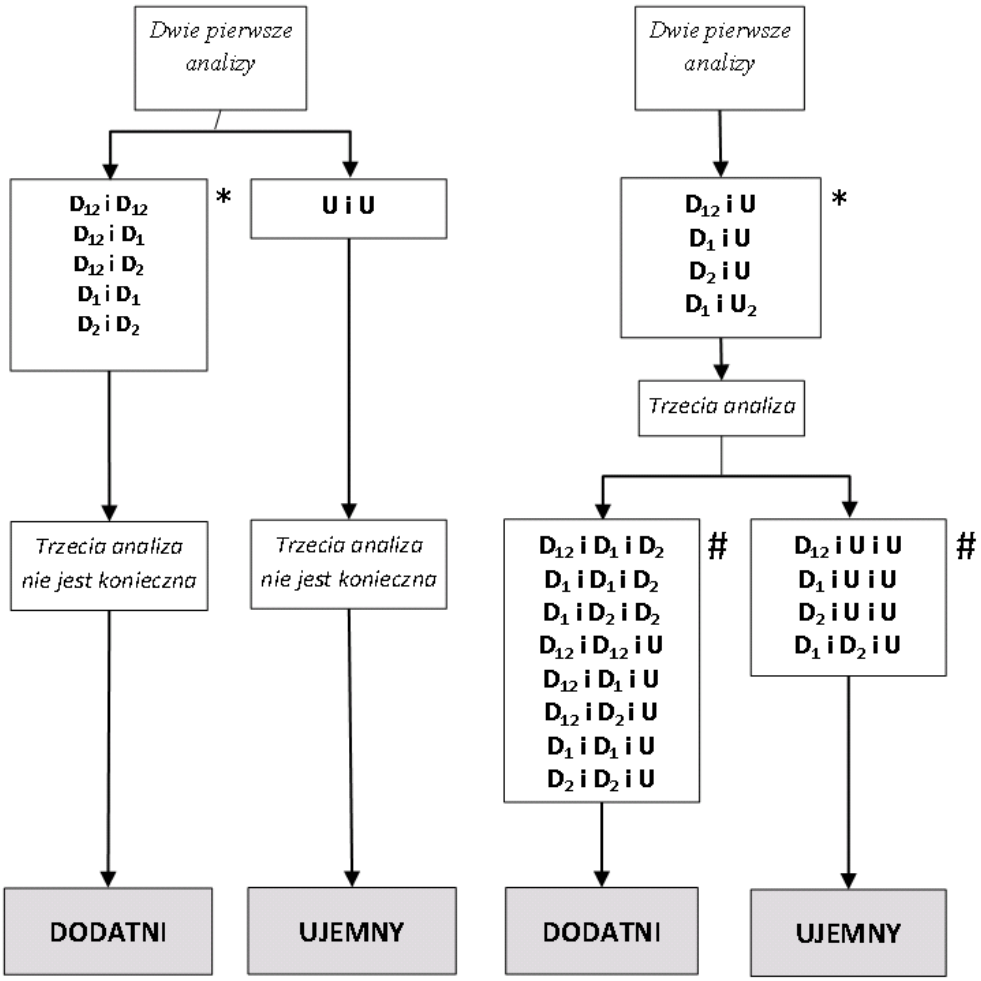
26. Na potrzeby pomiaru ekspresji *CD86/CD54* każdą badaną substancję chemiczną poddaje się badaniu w co najmniej dwóch niezależnych analizach, aby uzyskać pojedynczą prognozę (DODATNIĄ lub UJEMNĄ). Prognozę h-CLAT uznaje się za DODATNIĄ, jeżeli co najmniej jeden z przedstawionych poniżej warunków zostanie spełniony w dwóch niezależnych analizach na dwie lub w co najmniej dwóch niezależnych analizach na trzy – w przeciwnym wypadku prognozę h-CLAT uznaje się za UJEMNĄ (rys. 1):

— względna intensywność fluorescencji CD86 jest równa lub większa niż 150 % dla każdego badanego stężenia (dla którego żywotność komórek ≥ 50 %);

— względna intensywność fluorescencji CD54 jest równa lub większa niż 200 % dla każdego badanego stężenia (dla którego żywotność komórek ≥ 50 %).

27. W związku z powyższym jeżeli obie pierwsze analizy dadzą wynik dodatni dla CD86 lub obie dadzą wynik dodatni dla CD54, prognozę h-CLAT uważa się za DODATNIĄ i nie trzeba przeprowadzać trzeciej analizy. Analogicznie – jeżeli pierwsze dwie analizy dadzą wynik ujemny dla obu markerów, prognozę h-CLAT uważa się za UJEMNĄ (przy należytym uwzględnieniu przepisów pkt 30) bez konieczności przeprowadzania trzeciej analizy. Jeżeli jednak wyniki dwóch pierwszych analiz nie są zbieżne w odniesieniu do co najmniej jednego markera (CD54 lub CD86), należy przeprowadzić trzecią analizę, a prognoza końcowa będzie oparta na większości wyników z trzech osobnych analiz (tj. 2 z 3). W tym względzie należy zaznaczyć, że jeżeli przeprowadzono dwie niezależne analizy i jedna jest dodatnia tylko w odniesieniu do CD86 (zwana dalej D_1), a druga jest dodatnia tylko w odniesieniu do CD54 (zwana dalej D_2), konieczne jest przeprowadzenie trzeciej analizy. Jeżeli trzecia analiza jest ujemna w odniesieniu do obu markerów (zwana dalej U), prognozę h-CLAT uważa się za UJEMNĄ. Jeżeli jednak trzecia analiza jest dodatnia dla jednego z markerów (D_1 lub D_2) lub dla obu markerów (zwana dalej D_{12}), prognozę h-CLAT uważa się za DODATNIĄ.

▼**M8**



Rys. 1: Model prognozowania wykorzystywany w metodzie h-CLAT. Prognozę h-CLAT należy rozpatrywać w ramach IATA i zgodnie z przepisami pkt 7 i 8 wprowadzenia ogólnego.

D_1: analiza dodatnia tylko w odniesieniu do CD86; D_2: analiza dodatnia tylko w odniesieniu do CD54; D_{12}: analiza dodatnia w odniesieniu do CD86 i CD54; U: analiza niedodatnia ani w odniesieniu do CD86, ani w odniesieniu do CD54.

* W ramkach przedstawiono odpowiednie kombinacje wyników dwóch pierwszych analiz niezależnie od kolejności, w jakiej można je uzyskać.

W ramkach przedstawiono odpowiednie kombinacje wyników trzech analiz, na podstawie wyników uzyskanych w dwóch pierwszych analizach, przedstawionych w ramce powyżej, nie odzwierciedlając jednak kolejności, w jakiej można je uzyskać.

28. W odniesieniu do badanych substancji chemicznych, w przypadku których przewiduje się wynik DODATNI względem h-CLAT, opcjonalnie można określić dwie wartości stężenia efektywnego (EC), EC150 dla CD86 i EC200 dla CD54, tj. stężenia, przy którym badane substancje chemiczne indukują względną intensywność fluorescencji wynoszącą 150 lub 200. Te wartości stężenia efektywnego mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania uczulającego (9), gdy stosuje się je w kontekście podejść zintegrowanych takich jak IATA (4)(5)(6)(7)(8). Można je obliczyć, korzystając z poniższych równań:

▼M8

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

gdzie:

A_{conc} oznacza najniższe stężenie wyrażone w µg/ml przy RFI > 150 (CD86) lub 200 (CD54),

B_{conc} oznacza najwyższe stężenie wyrażone w µg/ml przy RFI < 150 (CD86) lub 200 (CD54),

A_{RFI} oznacza względną intensywność fluorescencji dla najniższego stężenia przy RFI > 150 (CD86) lub 200 (CD54),

B_{RFI} oznacza względną intensywność fluorescencji dla najwyższego stężenia przy RFI < 150 (CD86) lub 200 (CD54).

Aby uzyskać dokładniejsze wartości EC150 i EC200, konieczne może być przeprowadzenie trzech niezależnych analiz dotyczących *pomiaru ekspresji CD86/CD54*. Następnie ostateczne wartości EC150 oraz EC200 określa się jako wartość mediany EC wyliczanych na podstawie trzech niezależnych analiz. W przypadku gdy tylko dwie z trzech niezależnych analiz spełniają kryteria uznania za wyniki dodatnie (zob. pkt 26–27), przyjmuje się wyższą z wyliczonych wartości EC150 lub EC200.

Kryteria dopuszczalności

29. Podczas stosowania metody h-CLAT (22)(27) spełnione muszą zostać następujące kryteria dopuszczalności:

— żywotność komórek w podłożu oraz kontrolach z rozpuszczalnikiem/nośnikiem powinna być wyższa niż 90 %;

— w przypadku kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem wartości RFI zarówno w odniesieniu do CD86, jak i CD54 nie powinny przekraczać kryteriów uzyskania wyniku dodatniego (CD86 – RFI ≥ 150 % i CD54 – RFI ≥ 200 %). Wartości RFI kontroli z nośnikiem/rozpuszczalnikiem oblicza się, korzystając ze wzoru przedstawionego w pkt 25 („MFI substancji chemicznej” należy zastąpić „MFI nośnika/rozpuszczalnika”, a „MFI nośnika/rozpuszczalnika” należy zastąpić „MFI kontroli (podłoża)”);

— stosunek MFI zarówno CD86, jak i CD54 do kontroli izotypowej zarówno w podłożu, jak i w kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem powinien wynosić >105 %;

— w kontroli dodatniej (DNCB) wartości RFI zarówno CD86, jak i CD54 powinny spełniać kryteria uzyskania wyniku dodatniego (CD86 – RFI ≥ 150 % i CD54 – RFI ≥ 200), a żywotność komórek powinna być większa niż 50 %;

— jeżeli chodzi o badaną substancję chemiczną, żywotność komórek powinna być wyższa niż 50 % w przypadku co najmniej czterech stężeń badanych w każdej analizie.

30. Wyniki ujemne dopuszcza się wyłącznie w przypadku badanych substancji chemicznych charakteryzujących się żywotnością komórek niższą niż 90 % przy najwyższym badanym stężeniu (tj. 1,2 × CV75 zgodnie ze schematem dotyczącym serii rozcieńczeń w postępie geometrycznym opisanym w pkt 20). Jeżeli żywotność komórek przy stężeniu 1,2 × CV75 równa się lub przekracza 90 %, wynik ujemny należy odrzucić. W takim przypadku zaleca się podjęcie próby udoskonalenia dobrania dawki poprzez ponowne określenie wartości CV75. Należy zauważyć, że w przypadku stosowania jako maksymalnego stężenia badanej substancji chemicznej stężenia 5 000 µg/ml w soli fizjologicznej (lub podłożu, lub innych rozpuszczalnikach/nośnikach), stężenia 1 000 µg/ml w sulfotlenku dimetylu lub najwyższego stężenia rozpuszczalnego, wynik ujemny dopuszcza się nawet wówczas, gdy żywotność komórek przekracza 90 %.

▼M8

Sprawozdanie z badania

31. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

Substancja jednoskładnikowa

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

— wygląd fizyczny, log K_{ow}, rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— badane stężenie(-a);

— warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina

— opisana w miarę możliwości np. poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, przedstawienie informacji dotyczących występowania ilościowego oraz wskazanie istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej), w dostępnym zakresie;

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;

— masa cząsteczkowa lub pozorna masa cząsteczkowa w przypadku mieszanin lub polimerów o znanym składzie lub inne informacje istotne dla przebiegu badania;

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— badane stężenie(-a);

— warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Kontrole

Kontrola dodatnia

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

— wygląd fizyczny, log K_{ow}, rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie i w stosownych przypadkach;

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

▼**M8**

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— badane stężenie(-a);

— warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;

— odniesienie do wyników historycznych kontroli dodatnich wykazujących odpowiednie kryteria dopuszczalności analizy, w stosownych przypadkach.

Kontrola ujemna oraz kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— wygląd fizyczny, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne w przypadku stosowania innego rozpuszczalnika/nośnika kontrolnego niż te opisane w wytycznej dotyczącej badań, w dostępnym zakresie;

— warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Warunki badania

— nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań;

— opis zastosowanego badania;

— zastosowana linia komórkowa, warunki jej przechowywania oraz źródło (np. placówka, z której ją otrzymano);

— zastosowana cytometria przepływowa (np. model), w tym informacje na temat zastosowanych ustawień przyrządu, globuliny, przeciwciał i markera cytotoksyczności;

— procedura stosowana w celu wykazania biegłości laboratorium w zakresie przeprowadzania badania poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości lub procedura stosowana do wykazania odtwarzalności badania w czasie, np. dane historyczne dotyczące kontroli lub dane historyczne dotyczące kontroli reaktywności.

Kryteria dopuszczalności badania

— wartości dotyczące żywotności komórek, MFI oraz RFI uzyskane za pomocą kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem w porównaniu z zakresami dopuszczalności;

— wartości dotyczące żywotności komórek oraz RFI uzyskane za pomocą kontroli dodatniej w porównaniu z zakresami dopuszczalności;

— żywotność komórek przy wszystkich badanych stężeniach badanej substancji chemicznej.

▼M8

Procedura badawcza

— liczba zastosowanych analiz;

— stosowane stężenia badanej substancji chemicznej, procedura podawania badanej substancji chemicznej i czas narażenia (jeżeli są one inne niż zalecane);

— opis zastosowanych kryteriów oceny i podejmowania decyzji;

— opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej.

Wyniki

— tabelaryczne zestawienie danych, w tym wartości CV75 (w stosownych przypadkach), poszczególnych wartości geometrycznej MFI, RFI i żywotności komórek, wartości EC150/EC200 (w stosownych przypadkach), uzyskanych w odniesieniu do badanej substancji chemicznej oraz kontroli dodatniej w każdej analizie oraz wskazanie oceny badanej substancji chemicznej według modelu prognozowania;

— w stosownych przypadkach opis wszelkich innych istotnych obserwacji.

Omówienie wyników

— omówienie wyników uzyskanych za pomocą metody h-CLAT;

— uwzględnienie wyników zastosowania badania w kontekście IATA, jeżeli są dostępne inne odpowiednie informacje.

Wnioski

BIBLIOGRAFIA

(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) EURL-ECVAM UE (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Dostępne na stronie internetowej: 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). Dostępne na stronie internetowej: 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. Dostępne pod adresem: 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). „Protokół 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT)", s. 23. Dostępne na stronie internetowej: 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 (7^{th} 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. Seria dotycząca badań i oceny OECD. Francja, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, 96 s.

(22) OECD (2012). *The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins.* Part 1: Scientific Evidence. Seria dotycząca badań i oceny nr 168. Dostępne na stronie internetowej: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En)

(23) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2013). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). Wydanie piąte zmienione, Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. Europejskie Centrum ds. Ekotoksykologii i Toksykologii Substancji Chemicznych (sprawozdanie techniczne nr 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

Dodatek 1.1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności pomiędzy wynikami badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy przeprowadzeniu badania (21).

Mechanizm wywoływania skutków szkodliwych: sekwencja zdarzeń, począwszy od struktury chemicznej docelowej substancji chemicznej lub grupy podobnych substancji chemicznych poprzez molekularne zdarzenie inicjujące aż do pożądanego wyniku *in vivo* (22).

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

CV75: szacowane stężenie, przy którym żywotność komórek wynosi 75 %.

EC150: stężenia, przy których wartości RFI w ekspresji CD86 wynoszą 150.

EC200: stężenia, przy których wartości RFI w ekspresji CD54 wynoszą 200.

Cytometria przepływowa: technika cytometryczna, w której komórki zawieszone w cieczy przepływają jedna po drugiej przez zogniskowaną wiązkę wzbudzającego światła, które rozprasza się według wzorców charakterystycznych dla komórek i ich składników; komórki często oznacza się znacznikami fluorescencyjnymi, dzięki czemu światło jest najpierw absorbowane, a następnie emitowane w zmienionych częstotliwościach.

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub)populacji na taki czynnik.

IATA (zintegrowane podejście do badań i oceny): usystematyzowane podejście stosowane w odniesieniu do identyfikacji zagrożeń (potencjał), charakterystyki zagrożeń (siła oddziaływania) lub oceny bezpieczeństwa (potencjał / siła oddziaływania oraz narażenie) substancji chemicznej lub grupy substancji chemicznych; w ramach tego podejścia w sposób strategiczny integruje się i waży wszystkie istotne dane, które mogą wpłynąć na podjęcie decyzji regulacyjnej dotyczącej potencjalnego zagrożenia, ryzyka lub konieczności podjęcia dalszych ukierunkowanych, a przez to minimalnych badań.

Kontrola podłoża: kontrpróba niepoddana działaniu badanej substancji chemicznej zawierająca wszystkie składniki układu badawczego. Próbka ta jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji chemicznej oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia, czy rozpuszczalnik/nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji.

Substancja jednoskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

Substancja wieloskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu ≥10 % (w/w) i <80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się poprzez zmieszanie przynajmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

▼M8

Kontrola dodatnia: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, stopień reakcji dodatniej nie powinien być nadmierny.

Prehapteny: substancje chemiczne, które stają się czynnikami uczulającymi po transformacji abiotycznej.

Prohapteny: substancje chemiczne, które wymagają aktywacji enzymatycznej do uwolnienia swojego potencjalnego działania uczulającego na skórę.

Względna intensywność fluorescencji (RFI): wartości względne średniej geometrycznej intensywności fluorescencji (MFI) w komórkach poddanych działaniu substancji chemicznej w porównaniu z MFI w komórkach poddanych działaniu rozpuszczalnika/nośnika.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) badania (21).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim badanie może zostać przeprowadzone w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jego przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną (21).

Analiza: analiza obejmuje jednoczesne badanie jednej badanej substancji chemicznej lub większej liczby takich substancji w kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem i kontroli dodatniej.

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danego badania. Jest to miara dokładności badania, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności badania (21).

Roztwór buforowy do wybarwiania: roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami zawierający 0,1 % albuminy surowicy bydlęcej.

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego z wyjątkiem badanej substancji chemicznej, ale z uwzględnieniem stosowanego rozpuszczalnika/nośnika. Wykorzystywana jest do określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej lub stabilnie rozproszonej w tym samym rozpuszczalniku/nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą podłoża próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik/nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności badania, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności badania (21).

Substancja: pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania jego trwałości i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem ewentualnych rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody.

▼M8

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (23).

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

Ważne badanie: badanie, które uznano za wystarczająco istotne i wiarygodne dla danego celu i które opiera się na uzasadnionych naukowo podstawach. Badanie nie może zostać uznane za ważne w sensie absolutnym, ale tylko w odniesieniu do określonego celu (21).

▼M8

Dodatek 1.2

SUBSTANCJE SŁUŻĄCE DO WYKAZANIA BIEGŁOŚCI

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania opisanego w niniejszym dodatku do metody badawczej B.71 laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo określając prognozę h-CLAT dla 10 substancji wskazanych w tabeli 1 oraz określając wartości CV75, EC150 i EC200, które mieszczą się w odpowiednim zakresie odniesienia, dla co najmniej 8 z 10 substancji służących do wykazania biegłości. Substancje służące do wykazania biegłości wybrano w taki sposób, aby odzwierciedlić zakres reakcji na zagrożenia związane z działaniem uczulającym na skórę. Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz dostępnością wysokiej jakości danych *in vitro* uzyskanych w wyniku zastosowania metody h-CLAT. W odniesieniu do metody h-CLAT można znaleźć również opublikowane dane referencyjne (3)(14).

Tabela 1

Substancje zalecane do wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do metody h-CLAT

Substancje służące do wykazania biegłości	Numer CAS	Stan skupienia	Prognoza *in vivo* [1]	CV75 odniesienia CV75 w µg/ml [2]	Wynik badania h-CLAT dla CD86 (Zakres odniesienia EC150 w µg/ml) [2]	Wynik badania h-CLAT dla CD54 (Zakres odniesienia EC200 w µg/ml) [2]
2,4-dinitrochlorobenzen	97-00-7	Stały	Czynnik uczulający (wyjątkowo silny)	2–12	Dodatni (0,5–10)	Dodatni (0,5–15)
4-fenylenodiamina	106-50-3	Stały	Czynnik uczulający (silny)	5–95	Dodatni (<40)	Ujemny (>1,5) [3]
Siarczan niklu	10101-97-0	Stały	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	30–500	Dodatni (<100)	Dodatni (10–100)
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Stały	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	30–400	Ujemny (>10) [3]	Dodatni (10–140)
R(+)-limonen	5989-27-5	Ciekły	Czynnik uczulający (słaby)	>20	Ujemny (>5) [3]	Dodatni (<250)
Imidazolidynylomocznik	39236-46-9	Stały	Czynnik uczulający (słaby)	25–100	Dodatni (20–90)	Dodatni (20–75)
Izopropanol	67-63-0	Ciekły	Brak działania uczulającego	>5000	Ujemny (>5 000)	Ujemny (>5 000)
Glicerol	56-81-5	Ciekły	Brak działania uczulającego	>5000	Ujemny (>5 000)	Ujemny (>5 000)
Kwas mlekowy	50-21-5	Ciekły	Brak działania uczulającego	1500–5000	Ujemny (>5 000)	Ujemny (>5 000)
Kwas 4-aminobenzoesowy	150-13-0	Stały	Brak działania uczulającego	>1000	Ujemny (>1 000)	Ujemny (>1 000)

Skróty: Nr CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service.

[1] Prognoza zagrożenia (i siły działania) *in vivo* jest oparta na danych z badania LLNA (3)(14). Siłę działania *in vivo* określa się na podstawie kryteriów zaproponowanych przez ECETOC (24).

[2] Na podstawie historycznych wartości zaobserwowanych (13)(25).

[3] Dotychczas większość wyników otrzymywanych dla tego markera była ujemna, dlatego w większości przypadków oczekuje się wyniku ujemnego. Przedstawiony zakres określono na podstawie kilku wyników dodatnich zaobserwowanych w przeszłości. W przypadku uzyskania wyniku dodatniego wartość EC powinna mieścić się w zgłaszanym zakresie odniesienia.

▼**M8**

Dodatek 2

BADANIE DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO*: BADANIE AKTYWACJI LINII KOMÓRKOWEJ U937 (U-SENS™)

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

1. Badanie U-SENS™ pozwala określić ilościowo zmianę ekspresji markera powierzchniowego komórek związanego z procesem aktywacji monocytów i komórek dendrytycznych (tj. CD86) w ludzkiej linii komórkowej chłoniaka histiocytarnego U937 po narażeniu na działanie czynników uczulających (1). Pomiary poziomów ekspresji markera powierzchniowego komórek CD86 w linii komórkowej U937 wykorzystuje się później do wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania.

2. Badanie U-SENS™ oceniono w ramach badania walidacyjnego (2) koordynowanego przez L'Oreal i późniejszej niezależnej wzajemnej oceny przeprowadzonej przez Naukowy Komitet Doradczy (ESAC) działający przy laboratorium referencyjnym Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach (EURL ECVAM) (3). Uwzględniając wszystkie dostępne dowody i wkład ze strony organów regulacyjnych i zainteresowanych stron, EURL ECVAM (4) zaleciło stosowanie badania U-SENS™ w ramach IATA do wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco i substancji niewykazujących takiego działania na potrzeby klasyfikacji i oznakowania pod względem zagrożeń. W swoich wytycznych dotyczących zgłaszania usystematyzowanych podejść do integracji danych oraz poszczególnych źródeł informacji na temat działania uczulającego na skórę wykorzystywanych w ramach IATA OECD omawia szereg studiów przypadku, opisując różne strategie badań oraz modele prognozowania. Jedno z wielu zdefiniowanych podejść opiera się na teście U-SENS (5). Przykłady wykorzystania danych z badania U-SENS™ w połączeniu z innymi informacjami, w tym z danymi historycznymi oraz istniejącymi ważnymi danymi dotyczącymi ludzi (6), są także zamieszczone w innych pozycjach literatury (4)(5)(7).

3. Udowodniono, że badanie U-SENS™ można przeprowadzać również w laboratoriach posiadających doświadczenie w zakresie kultury komórkowej i analizy przy użyciu cytometrii przepływowej. Poziom odtwarzalności prognoz, którego można oczekiwać od tego badania, ma wartość rzędu 90 % i 84 % odpowiednio wewnątrz laboratoriów i pomiędzy nimi (8). Wyniki uzyskane w badaniu walidacyjnym (8) i innych opublikowanych badaniach (1) ogólnie wskazują na to, że – w porównaniu z wynikami LLNA – dokładność rozróżniania substancji działających uczulająco na skórę (tj. należących do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania wynosi 86 % (N = 166) przy czułości na poziomie 91 % (118/129) oraz swoistości na poziomie 65 % (24/37). W porównaniu z wynikami badań przeprowadzonych na ludziach dokładność rozróżniania substancji działających uczulająco na skórę (tj. należących do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania wynosi 77 % (N = 101) przy czułości na poziomie 100 % (58/58) oraz swoistości na poziomie 47 % (20/43). Prawdopodobieństwo wystąpienia prognoz fałszywie ujemnych przy zastosowaniu badania U-SENS™ (w porównaniu do LLNA) jest większe w przypadku substancji chemicznych wykazujących niską lub średnią siłę działania uczulającego na skórę (tj. należących do podkategorii 1B wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) niż w przypadku substancji wykazujących wysoką siłę działania uczulającego na skórę (tj. należących do podkategorii 1A wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) (1)(8)(9). Wszystkie te informacje łącznie wskazują na użyteczność badania U-SENS™ w identyfikowaniu zagrożeń związanych z działaniem uczulającym na skórę. Przedstawione tutaj wartości dokładności U-SENS™ jako samodzielnego badania są jednak wyłącznie orientacyjne, ponieważ badanie to należy rozpatrywać w połączeniu z innymi źródłami informacji w kontekście IATA i zgodnie z przepisami pkt 7 i 8 wprowadzenia ogólnego. Co więcej, przy ocenie metod niewymagających wykorzystania zwierząt pod kątem działania uczulającego na skórę należy pamiętać, że LLNA, jak również inne badania przeprowadzane na zwierzętach, mogą nie w pełni odzwierciedlać sytuację w odniesieniu do ludzi.

▼M8

4. Na podstawie obecnie dostępnych danych wykazano, że badanie U-SENS™ ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych (w tym do składników kosmetycznych, np. konserwantów, środków powierzchniowo czynnych, substancji czynnych, barwników) obejmujących szereg organicznych grup funkcyjnych, właściwości fizykochemicznych, sił działania uczulającego na skórę (jak określono w badaniach *in vivo*) oraz spektrum mechanizmów reagowania, o których wiadomo, że mają związek z działaniem uczulającym na skórę (np. akceptor Michaela, powstawanie zasady Schiffa, przenośnik grup acylowych, dwucząsteczkowa substytucja nukleofilowa [S_N2] lub aromatyczna substytucja nukleofilowa [S_NAr]) (1)(8)(9)(10). Badanie U-SENS™ ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych, które są rozpuszczalne lub tworzą stabilną dyspersję (tj. koloid lub zawiesinę, w których badana substancja chemiczna nie osadza się ani nie oddziela od rozpuszczalnika/nośnika w różne fazy) w odpowiednim rozpuszczalniku/nośniku (zob. pkt 13). W badaniu U-SENS™ w sposób prawidłowy przewidziano substancje chemiczne zgłaszane w zbiorze danych jako prehapteny (tj. substancje aktywowane przez utlenianie) lub prohapteny (tj. substancje wymagające aktywacji enzymatycznej, np. przez enzymy P450) (1)(10). Stosowanie substancji powodujących przerwanie błony komórkowej może doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie dodatnich z powodu niespecyficznego wzrostu ekspresji CD86 – 3 na 7 wyników fałszywie dodatnich względem klasyfikacji odniesienia *in vivo* spowodowane było stosowaniem środków powierzchniowo czynnych (1). Do wyników dodatnich uzyskanych przy zastosowaniu środków powierzchniowo czynnych jako takich należy podchodzić z ostrożnością, natomiast wyniki ujemne uzyskane przy zastosowaniu środków powierzchniowo czynnych można dalej wykorzystywać do wsparcia identyfikacji badanej substancji chemicznej jako substancji niewykazującej działania uczulającego na skórę. Fluorescencyjne badane substancje chemiczne można ocenić za pomocą badania U-SENS™ (1), jednak badane substancje chemiczne o wysokiej fluorescencji emitujące fale tej samej długości co izotiocyjanian fluoresceiny (FITC) lub jodek propidyny będą zakłócać detekcję przy użyciu cytometrii przepływowej, co uniemożliwia ich prawidłową ocenę z wykorzystaniem przeciwciał skoniugowanych z FITC (potencjalny wynik fałszywie ujemny) lub jodku propidyny (brak możliwości pomiaru żywotności). W takim przypadku można użyć odpowiednio innych przeciwciał znakowanych fluorochromem lub innych markerów cytotoksyczności, o ile można wykazać, że pozwalają one uzyskać wyniki podobne do wyników otrzymywanych w przypadku przeciwciał znakowanych FITC lub jodku propidyny (zob. pkt 18), np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.2. W świetle powyższego wyniki dodatnie uzyskane przy zastosowaniu środków powierzchniowo czynnych oraz wyniki ujemne uzyskane przy zastosowaniu badanych substancji chemicznych o wysokiej fluorescencji należy interpretować w kontekście zdefiniowanych ograniczeń i w połączeniu z innymi źródłami informacji w ramach IATA. W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania badania U-SENS™ w odniesieniu do innych konkretnych kategorii badanych substancji chemicznych, nie należy jej stosować w odniesieniu do tych konkretnych kategorii.

5. Jak opisano powyżej, badanie U-SENS™ wspiera rozróżnienie substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania. Może ono jednak również potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania uczulającego, gdy stosuje się je w ramach podejść zintegrowanych takich jak IATA. Wymagane jest jednak przeprowadzenie dalszych prac, najlepiej na podstawie danych dotyczących ludzi, aby ustalić, w jaki sposób wyniki badania U-SENS™ mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania.

6. Definicje znajdują się w dodatku 2.1.

ZASADA BADANIA

7. Badanie U-SENS™ jest testem *in vitro*, który pozwala określić ilościowo zmiany ekspresji markera powierzchniowego komórki CD86 w ludzkiej linii komórkowej chłoniaka histiocytarnego, tj. komórkach U937, po 45 ± 3 godzinach narażenia na działanie badanej substancji chemicznej. Marker powierzchniowy CD86 jest jednym z typowych markerów aktywacji U937. Wiadomo, że CD86 jest cząsteczką kostymulującą, która może naśladować aktywację monocytów, która odgrywa kluczową rolę w uczulaniu limfocytów T. Zmiany ekspresji markera powierzchniowego CD86 mierzy się za pomocą cytometrii przepływowej, zwykle korzystając z przeciwciał znakowanych izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC). Jednocześnie przeprowadza się również pomiar cytotoksyczności (np. z wykorzystaniem jodku

▼M8

propidyny), aby ocenić, czy podwyższona ekspresja markera powierzchniowego komórki CD86 zachodzi przy stężeniach niższych niż stężenia cytotoksyczne. Wskaźnik stymulacji (S.I.) markera powierzchniowego komórki CD86 w porównaniu z kontrolą z rozpuszczalnikiem/nośnikiem wylicza się i wykorzystuje w modelu prognozowania (zob. pkt 19), aby wesprzeć rozróżnienie substancji działających uczulająco i substancji niewykazujących takiego działania.

WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

8. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania opisanego w niniejszym dodatku do metody badawczej B.71 laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną z zastosowaniem dziesięciu substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.2 zgodnie z dobrymi praktykami w zakresie metody *in vitro* (11). Ponadto użytkownicy badania powinni prowadzić bazę danych historycznych wygenerowanych podczas kontroli reaktywności (zob. pkt 11) oraz kontroli dodatnich i kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem (zob. pkt 15–16), a także wykorzystywać te dane do potwierdzenia zachowania odtwarzalności badania w swoim laboratorium w miarę upływu czasu.

PROCEDURA

9. Podstawę niniejszego badania stanowi protokół nr 183 bazy danych na temat metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach (DB-ALM) dotyczący U-SENS™ (12). Ze standardowych procedur operacyjnych należy korzystać przy wdrażaniu i wykonywaniu badania U-SENS™ w laboratorium. Badanie U-SENS™ można przeprowadzić, korzystając z zautomatyzowanego systemu, jeżeli można wykazać, że pozwala on uzyskać podobne wyniki, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.2. Poniżej opisano główne elementy i procedury badania U-SENS™.

Przygotowanie komórek

10. Do badania U-SENS™ należy wykorzystać ludzką linię komórkową chłoniaka histiocytarnego – U937 (13). Komórki (klon CRL1593.2) należy pozyskać z banku komórek posiadającego niezbędne uprawnienia, takiego jak np. zbiór kultur typu amerykańskiego.

11. Komórki U937 hoduje się w temperaturze 37 °C, w obecności 5 % CO_2 i w wilgotnym środowisku, w podłożu RPMI-1 640 z dodatkiem 10 % cielęcej surowicy płodowej, 2 mM L-glutaminy, 100 jednostek/ml penicyliny i 100 μg/ml streptomycyny (kompletne podłoże). Pasaż komórek U937 odbywa się regularnie co 2–3 dni w gęstości odpowiednio 1,5 lub 3×10^5 komórek/ml. Zagęszczenie komórek nie powinno przekraczać 2×10^6 komórek/ml, a żywotność komórek mierzona poprzez wykluczenie komórek wybarwionych błękitem trypanu powinna wynosić ≥ 90 % (metody tej nie należy stosować przy pierwszym pasażu następującym po rozmrożeniu). Przed wykorzystaniem komórek do badań każdą partię komórek, płodowej surowicy cielęcej lub przeciwciał należy zakwalifikować do badań, przeprowadzając kontrolę reaktywności. Kontrolę reaktywności komórek należy przeprowadzić, wykorzystując do tego celu kontrolę dodatnią, tj. kwas pikrylosulfonowy (kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy, TNBS) (nr CAS 2 508-19-2, ≥ 99 % czystości), oraz kontrolę ujemną, tj. kwas mlekowy (LA) (nr CAS 50-21-5, ≥ 85 % czystości), co najmniej tydzień po rozmrożeniu. Podczas kontroli reaktywności należy zbadać sześć stężeń końcowych w każdej z 2 kontroli (TNBS: 1; 12,5; 25; 50; 75; 100 μg/ml, oraz LA: 1; 10; 20; 50; 100; 200 μg/ml). Rozpuszczenie TNBS w kompletnym podłożu powinno wywołać reakcję dodatnią CD86, która powinna być powiązana ze stężeniem (np. gdy po uzyskaniu stężenia dodatniego (wskaźnik stymulacji CD86 ≥150) następuje stężenie charakteryzujące się wzrastającą wartością wskaźnika stymulacji CD86), a rozpuszczenie kwasu mlekowego w kompletnym podłożu powinno wywołać reakcję ujemną CD86 (zob. pkt 21). Do analizy należy wykorzystać jedynie partię komórek, która dwukrotnie przeszła kontrolę reaktywności. Komórki można rozmnażać do siedmiu tygodni po rozmrożeniu. Liczba pasaży nie powinna przekraczać 21. Kontrolę reaktywności należy przeprowadzić zgodnie z procedurami opisanymi w pkt 18–22.

▼M8

12. Komórki U937 wysiewa się do badań w gęstości 3 x 10^5 komórek/ml albo 6 × 10^5 komórek/ml i dokonuje ich wstępnej hodowli w kolbach z kulturami odpowiednio przez 2 dni lub 1 dzień. Można zastosować inne warunki hodowli wstępnej niż warunki opisane powyżej, jeżeli przedstawione zostanie wystarczające uzasadnienie naukowe oraz jeżeli można wykazać, że pozwalają one uzyskać podobne wyniki, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.2. W dniu badania komórki pobrane z kolby z kulturami zawiesza się ponownie w świeżym podłożu w gęstości 5 × 10^5 komórek/ml. Następnie komórki umieszcza się w dołkach 96-dołkowej płytki płaskodennej w objętości po 100 µl (końcowe zagęszczenie komórek – 0,5 × 10^5 komórek/dołek).

Przygotowanie badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych

13. Ocenę rozpuszczalności przeprowadza się przed badaniem. W tym celu badane substancje chemiczne są rozpuszczane lub tworzą stabilne dyspersje o stężeniu 50 mg/ml w kompletnym podłożu (pierwszy wariant rozpuszczalnika) lub w sulfotlenku dimetylu (DMSO, czystość ≥99 %) (drugi wariant rozpuszczalnika/nośnika), jeżeli badana substancja chemiczna nie rozpuszcza się w rozpuszczalniku/nośniku kompletnego podłoża. Na potrzeby badania badaną substancję chemiczną rozpuszcza się do uzyskania stężenia końcowego wynoszącego 0,4 mg/ml w kompletnym podłożu, jeżeli substancja chemiczna jest rozpuszczalna w danym rozpuszczalniku/nośniku. Jeżeli substancja chemiczna jest rozpuszczalna jedynie w sulfotlenku dimetylu, rozpuszcza się ją w stężeniu 50 mg/ml. Można użyć innych rozpuszczalników/nośników niż te opisane powyżej pod warunkiem przedstawienia wystarczającego uzasadnienia naukowego. Należy uwzględnić stabilność badanej substancji chemicznej w końcowym rozpuszczalniku/nośniku.

14. Badane substancje chemiczne oraz substancje kontrolne przygotowuje się w dniu badania. Z uwagi na nieprzeprowadzanie testu ustalającego dawkę na potrzeby pierwszej analizy należy przeprowadzić badania 6 stężeń końcowych (1, 10, 20, 50, 100 i 200 µg/ml) w odpowiednim rozpuszczalniku/nośniku albo w kompletnym podłożu, albo w 0,4 % sulfotlenku dimetylu w podłożu. Na potrzeby kolejnych analiz, przy użyciu odpowiedniego rozpuszczalnika/nośnika, przygotowuje się roztwory badanych substancji chemicznych – co najmniej 4 roztwory robocze (tj. w co najmniej 4 stężeniach), zaczynając od stężenia 0,4 mg/ml w kompletnym podłożu lub stężenia 50 mg/ml w sulfotlenku dimetylu. Roztwory robocze ostatecznie wykorzystuje się w celu poddania działaniu substancji chemicznej poprzez dodanie zawiesiny komórkowej linii U937 (zob. pkt 11 powyżej) w objętości równej objętości roztworu roboczego na płytce, aby osiągnąć dalsze dwukrotne rozcieńczenie (12). Doboru stężeń (co najmniej 4 stężeń), które mają zostać wykorzystane na potrzeby kolejnej analizy, dokonuje się w oparciu o poszczególne wyniki wszystkich poprzednich analiz (8). Użytkowe stężenia końcowe: 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. Maksymalne stężenie końcowe wynosi 200 µg/ml. W przypadku zaobserwowania wartości dodatniej CD86 przy stężeniu 1 µg/ml ocenie poddaje się stężenie 0,1 µg/ml, aby ustalić stężenie badanej substancji chemicznej, które nie wywołuje przekroczenia przez CD86 progu uzyskania wyniku dodatniego. Jeżeli zaobserwowano dodatnią zależność stężenie-odpowiedź w odniesieniu do CD86, na potrzeby każdej analizy wylicza się wartość EC150 (stężenie, przy którym substancja chemiczna osiąga próg uzyskania wyniku dodatniego dla CD86 wynoszący 150 %, zob. pkt 19). W przypadku gdy badana substancja chemiczna wywołuje reakcję dodatnią CD86 niepowiązaną ze stężeniem, obliczenie wartości EC150 może nie być istotne, jak opisano w protokole nr 183 DB-ALM dotyczącym U-SENS™ (12). Na potrzeby każdej analizy – gdy tylko jest to możliwe – wylicza się wartość CV70 (stężenie, przy którym substancja chemiczna osiąga próg cytotoksyczności wynoszący 70 %, zob. pkt 19) (12). Aby zbadać wpływ wzrostu ekspresji CD86 na zależność stężenie-odpowiedź, spośród stężeń użytkowych należy wybrać dowolne stężenia, których wartości są równomiernie rozłożone między EC150 (lub najwyższym ujemnym stężeniem niecytotoksycznym CD86) a CV70 (lub najwyższym dopuszczalnym stężeniem, tj. 200 µg/ml). W każdej analizie należy zbadać co najmniej 4 stężenia, przy czym w celu zapewnienia porównywalności co najmniej 2 stężenia powinny być takie same jak w poprzedniej analizie / poprzednich analizach.

▼M8

15. W ramach kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem w badaniu U-SENS™ stosuje się kompletne podłoże (w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczonych lub tworzących stabilne dyspersje w kompletnym podłożu) (zob. pkt 4) lub sulfotlenek dimetylu w stężeniu 0,4 % w kompletnym podłożu (w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczonych lub tworzących stabilne dyspersje w sulfotlenku dimetylu).

16. W ramach kontroli dodatniej w badaniu U-SENS™ (zob. pkt 11) stosuje się TNBS, przygotowany w kompletnym podłożu. TNBS należy stosować jako kontrolę dodatnią na potrzeby pomiaru ekspresji CD86 w końcowym pojedynczym stężeniu na płytce (50 µg/ml) pozwalającym uzyskać żywotność komórek na poziomie > 70 %. W celu uzyskania na płytce stężenia TNBS wynoszącego 50 µg/ml przygotowuje się 1-molowy (tj. o stężeniu 293 mg/ml) roztwór podstawowy TNBS w kompletnym podłożu, który następnie rozcieńcza się 2 930-krotnie w kompletnym podłożu do uzyskania roztworu roboczego o stężeniu 100 µg/ml. Kwas mlekowy (LA, nr CAS 50-21-5) powinien być stosowany jako kontrola ujemna w stężeniu 200 µg/ml, rozpuszczony w kompletnym podłożu (z roztworu podstawowego o stężeniu 0,4 mg/ml). W każdej płytce z każdej analizy przygotowuje się po trzy kontrpróby: kontroli niepoddanej działaniu substancji chemicznej z kompletnym podłożem, kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem oraz kontroli ujemnej i dodatniej (12). Można stosować inne odpowiednie kontrole dodatnie, jeżeli dostępne są dane historyczne pozwalające na uzyskanie porównywalnych kryteriów dopuszczalności analizy. Kryteria dopuszczalności analizy są takie same jak kryteria opisane w odniesieniu do badanej substancji chemicznej (zob. pkt 12).

Podawanie badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych

17. Kontrolę z rozpuszczalnikiem/nośnikiem lub roztwory robocze opisane w pkt 14–16 miesza się w stosunku 1:1 (obj.) z zawiesinami komórkowymi przygotowanymi w dołkach 96-dołkowej płytki płaskodennej (zob. pkt 12). Następnie płytki poddane działaniu substancji inkubuje się przez 45 ± 3 godziny w temperaturze 37 °C w obecności 5 % CO_2. Przed inkubacją płytki uszczelnia się półprzepuszczalną membraną, aby nie dopuścić do odparowania lotnych badanych substancji chemicznych i aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu między komórkami poddanymi działaniu badanych substancji chemicznych (12).

Wybarwianie komórek

18. Po narażeniu na działanie substancji chemicznej przez 45 godzin ± 3 godziny komórki przenosi się na mikropłytkę z dnem w kształcie litery V i zbiera się przez odwirowanie. Interferencję rozpuszczalności definiuje się jako kryształy lub krople obserwowane pod mikroskopem w po upływie 45 ± 3 godzin po poddaniu działaniu substancji (przed wybarwieniem komórek). Supernatanty odrzuca się, a pozostałe komórki przemywa się raz w 100 µl silnie schłodzonego roztworu chlorku sodu buforowanego fosforanami (PBS) zawierającego 5 % cielęcej surowicy płodowej (roztwór buforowy do wybarwiania). Po odwirowaniu komórki ponownie zawiesza się w 100 µl roztworu buforowego do wybarwiania i wybarwia się za pomocą 5 µl (np. 0,25 µg) przeciwciał anty-CD86 lub mysich przeciwciał IgG1 (izotyp) znakowanych FITC w temperaturze 4 °C przez 30 minut, chronionych przed światłem. Należy wykorzystać przeciwciała opisane w protokole nr 183 DB-ALM dotyczącym U-SENS™ (12) (w odniesieniu do CD86: BD-PharMingen #5556 57 klon: Fun-1 lub Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klon: BU63; oraz w odniesieniu do IgG1: BD-PharMingen #5557 48 lub Caltag/Invitrogen # GM4992). Z doświadczenia naukowców opracowujących badanie wynika, że intensywność fluorescencji przeciwciał jest zwykle stała w różnych partiach. Do testu można wykorzystać inne klony lub przeciwciała od innego dostawcy, które pomyślnie przeszły kontrolę reaktywności (zob. pkt 11). Użytkownicy mogą jednak rozważyć miareczkowanie przeciwciał w warunkach własnego laboratorium, aby określić stężenie, które jest najbardziej stosowne dla danego zastosowania. Można wykorzystać inny system detekcji, np. przeciwciała anty-CD86 znakowane fluorochromem, jeżeli można wykazać, że pozwala on uzyskać wyniki podobne do wyników otrzymywanych w przypadku wykorzystania przeciwciał skoniugowanych z FITC, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.2. Po dwukrotnym przemyciu w 100 µl roztworu buforowego do wybarwiania i jednokrotnym przemyciu w 100 µl silnie schłodzonego PBS komórki zawiesza się ponownie w silnie schłodzonym PBS (np. w 125 µl w przypadku próbek analizowanych ręcznie probówka po

▼M8

probówce lub w 50 µl przy użyciu płytki do autosamplera) i dodaje się roztwór jodku propidyny (stężenie końcowe wynoszące 3 µg/ml). Można wykorzystać inne markery cytotoksyczności, takie jak 7-aminoaktynomycyna D (7-AAD) lub błękit trypanu, jeżeli można wykazać, że alternatywne barwniki pozwalają uzyskać wyniki podobne do wyników otrzymywanych w przypadku wykorzystania jodku propidyny, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.2.

Analiza przy użyciu cytometrii przepływowej

19. Poziom ekspresji CD86 i żywotność komórek analizuje się przy pomocy cytometrii przepływowej. Komórki przedstawia się na wykresie punktowym uwzględniającym parametry wielkości (FSC) i ziarnistości (SSC) w skali logarytmicznej, aby wyraźnie określić populację w pierwszej bramce R1 i wyeliminować pozostałości komórkowe. Na każdy dołek w bramce R1 pozyskuje się docelowo łącznie 10 000 komórek. Komórki z tej samej bramki R1 przedstawia się na wykresie punktowym uwzględniającym parametry FL3 lub FL4 / SSC. Komórki żywotne wyznacza się poprzez umieszczenie drugiej bramki R2, która pozwala wyodrębnić populację komórek niewybarwionych jodkiem propidyny (kanał FL3 lub FL4). Żywotność komórek można obliczyć za pomocą poniższego równania, korzystając z programu do analizy cytometrycznej. Przy niskiej żywotności komórek można pozyskać do 20 000 komórek, wśród których znajdują się martwe komórki. Ewentualnie dane można pozyskać w ciągu jednej minuty od rozpoczęcia analizy.

$$\dot{Z}ywotność\ komórek = \frac{Liczba\ żywych\ komórek}{Łączna\ liczba\ pozyskanych\ komórek} \times 100$$

Następnie mierzy się odsetek tych żywych komórek FL1-dodatnich w bramce R2 (wewnątrz bramki R1). Ekspresję CD86 na powierzchni komórek analizuje się na wykresie punktowym w układzie współrzędnych FL1 / SSC w bramce zawierającej komórki żywotne (R2).

W przypadku dołków zawierających kompletne podłoże / IgG1 znacznik analizy ustawia się blisko głównej populacji, tak aby w kontrolach z kompletnym podłożem przeciwciała IgG1 znajdowały się w strefie docelowej wynoszącej 0,6–0,9 %.

Interferencję barw definiuje się jako przesunięcie wykresu punktowego IgG1 znakowanego FITC (średnia geometryczna wskaźnika symulacji IgG1 FL1 ≥150 %).

Indeks stymulacji (S.I.) CD86 komórek kontrolnych (niepoddanych działaniu substancji lub zawieszonych w sulfotlenku dimetylu o stężeniu 0,4 %) i komórek poddanych działaniu substancji chemicznej oblicza się według następującego równania:.

$$S.I. = \frac{\%\ komórek 86^{+} poddanych\ działaniu\ substancji\ chemicznej - \%\ komórek\ IgG1^{+} poddanych\ działaniu\ substancji\ chemicznej}{\%\ komórek\ CD86^{+} wkontroli - \%\ komórek\ IgG1^{+} wkontroli} \times 100$$

% komórek $IgG1^{+}$ w kontroli niepoddanej działaniu substancji chemicznej: oznacza odsetek komórek IgG1 FL1-dodatnich wyznaczonych za pomocą znacznika analizy (dopuszczalny zakres: ≥ 0,6 % i < 1,5 %, zob. pkt 22) w komórkach żywotnych niepoddanych działaniu substancji chemicznej.

% komórek $IgG1^{+}/CD86^{+}$ kontrolnych / poddanych działaniu substancji chemicznej: oznacza odsetek komórek IgG1/CD86 FL1-dodatnich, mierzony bez przesuwania znacznika analizy, w żywych komórkach kontrolnych / poddanych działaniu substancji chemicznej.

▼**M8**

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena danych

20. W ramach badania U-SENS™ oblicza się następujące parametry: wartość CV70, tj. stężenie, przy którym przeżywalność komórek linii U937 wynosi 70 % (cytotoksyczność na poziomie 30 %), i wartość EC150, tj. stężenie, przy którym badane substancje chemiczne wywołały indeks stymulacji CD86 (S.I.) wynoszący 150 %.

Do obliczenia wartości CV70 stosuje się interpolację logarytmiczno-liniową według następującego równania:

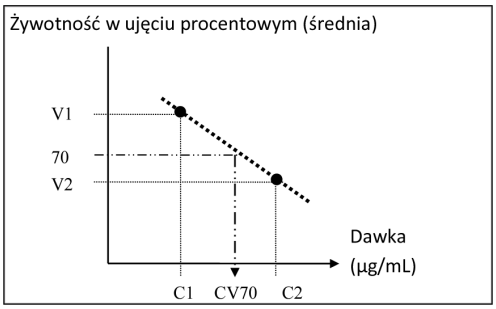
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

gdzie:

V1 oznacza minimalną wartość żywotności komórek powyżej 70 %;

V2 oznacza maksymalną wartość żywotności komórek powyżej 70 %;

C1 i C2 oznaczają stężenia wskazujące odpowiednio wartość żywotności komórek V1 i V2.



Można stosować inne podejścia do określania wartości CV70 pod warunkiem wykazania braku wpływu na wyniki (np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości).

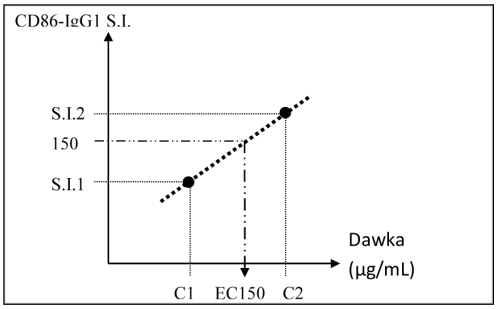
Do obliczenia wartości EC150 stosuje się interpolację logarytmiczno-liniową według następującego równania:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

gdzie:

C1 oznacza najwyższe stężenie wyrażone w µg/ml przy wskaźniku stymulacji CD86 wynoszącym < 150 % (S.I. 1);

C2 oznacza najniższe stężenie wyrażone w µg/ml przy wskaźniku stymulacji CD86 wynoszącym ≥150 % (S.I. 2).



▼M8

Wartości EC150 i CV70 oblicza się

— na potrzeby każdej analizy: poszczególne wartości EC150 i CV70 wykorzystuje się jako narzędzia do badania wpływu wzrostu ekspresji CD86 na zależność stężenie-odpowiedź (zob. pkt 14);

— na podstawie średniej żywotności określa się ogólną wartość CV70 (12);

— na podstawie średnich wartości wskaźnika stymulacji CD86 określa się ogólną wartość EC150 dla badanej substancji chemicznej, w odniesieniu do której przewiduje się uzyskanie wyniku DODATNIEGO w badaniu U-SENS™ (zob. pkt 21) (12).

Model prognozowania

21. Na potrzeby pomiaru ekspresji CD86 każdą badaną substancję chemiczną bada się w co najmniej czterech stężeniach i w co najmniej dwóch niezależnych analizach (wykonanych innego dnia) w celu uzyskania pojedynczej prognozy (UJEMNEJ lub DODATNIEJ).

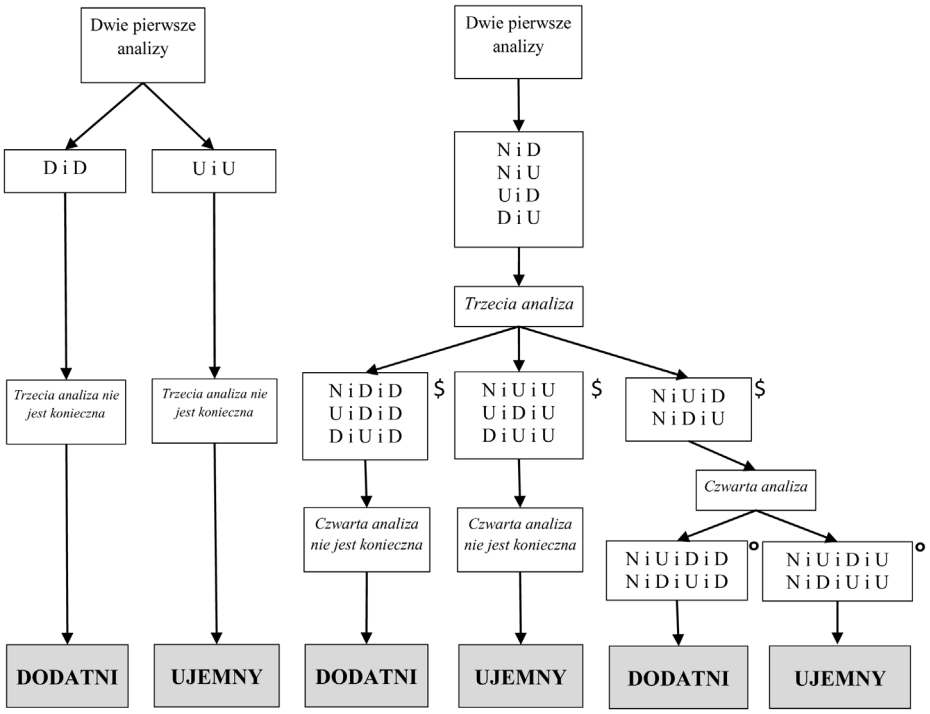
— Pojedynczy wynik analizy przeprowadzonej w ramach badania U-SENS™ uznaje się za ujemny (zwany dalej „U”), jeżeli wskaźnik stymulacji CD86 wynosi mniej niż 150 % we wszystkich stężeniach niecytotoksycznych (żywotność komórek ≥70 %) i jeżeli nie zaobserwowano żadnych zakłóceń (cytotoksyczność, rozpuszczalność: zob. pkt 18 lub barwa: zob. pkt 19 niezależnie od wartości stężeń niecytotoksycznych, przy których wykryto zakłócenia). We wszystkich innych przypadkach: gdy zaobserwowano wskaźnik stymulacji CD86 większy lub równy 150 % lub zakłócenia, pojedynczy wynik analizy U-SENS™ uznaje się za dodatni (zwany dalej „D”).

— Prognozę badania U-SENS™ uważa się za UJEMNĄ, jeżeli wyniki co najmniej dwóch niezależnych analiz są ujemne (U) (rys.1). Jeżeli obie pierwsze analizy dały wyniki ujemne (U), prognozę badania U-SENS™ uznaje się na UJEMNĄ i nie ma potrzeby przeprowadzania trzeciej analizy.

— Prognozę U-SENS ™ uważa się za DODATNIĄ, jeżeli wyniki co najmniej dwóch niezależnych analiz są dodatnie (D) (rys.1). Jeżeli obie pierwsze analizy dały wyniki dodatnie (D), prognozę badania U-SENS™ uznaje się na DODATNIĄ i nie ma potrzeby przeprowadzania trzeciej analizy.

— Z uwagi na nieprzeprowadzanie testu ustalającego dawkę wyjątek stanowi sytuacja, w której w pierwszej analizie wskaźnik stymulacji CD86 jest wyższy lub równy 150 % jedynie przy najwyższym stężeniu niecytotoksycznym. Analizę uznaje się wówczas za NIEJEDNOZNACZNĄ (N), a dodatkowe stężenia (pomiędzy najwyższym stężeniem niecytotoksycznym a najniższym stężeniem cytotoksycznym – zob. pkt 20) należy zbadać w ramach dodatkowych analiz. Jeżeli wynik analizy uznano za niejednoznaczny, należy przeprowadzić co najmniej 2 dodatkowe analizy, a czwartą analizę należy przeprowadzić w przypadku, gdy analizy druga i trzecia nie są ze sobą zbieżne (tj. gdy niezależnie uzyskano wyniki U lub D) (rys. 1). Wyniki dalszych analiz zostaną uznane za dodatnie nawet wówczas, gdy tylko jedno stężenie niecytotoksyczne CD86 pozwala uzyskać wynik równy lub wyższy niż 150 %, ponieważ ustalanie stężeń dostosowano do konkretnej badanej substancji chemicznej. O prognozie końcowej przesądzi większość wyników trzech lub czterech osobnych analiz (tj. dwie z trzech lub dwie z czterech) (rys. 1).

▼**M8**



Rys. 1: Model prognozowania wykorzystywany w badaniu U-SENS™. Prognozę U-SENS™ należy rozpatrywać w ramach IATA oraz zgodnie z przepisami pkt 4 i przepisami pkt 7, 8 i 9 wprowadzenia ogólnego.

U: analiza, w której nie zaobserwowano wyniku dodatniego w odniesieniu do CD86 ani żadnych zakłóceń;

D: analiza, w której zaobserwowano wynik dodatni w odniesieniu do CD86 lub zakłócenia;

N: wynik niejednoznaczny. Pierwsza analiza, której wynik uznano za niejednoznaczny, gdy w odniesieniu do CD86 zaobserwowano wynik dodatni przy najwyższym stężeniu niecytotoksycznym;

#: pojedynczy wynik niejednoznaczny (N) przypisany tylko do pierwszej analizy automatycznie pociąga za sobą konieczność przeprowadzenia trzeciej analizy, aby uzyskać większość wyników dodatnich (D) lub ujemnych (U) w co najmniej dwóch z trzech niezależnych analiz;

$: w polach przedstawiono odpowiednie kombinacje wyników trzech analiz na podstawie wyników uzyskanych w dwóch pierwszych analizach przedstawionych w ramce powyżej;

°: w polach przedstawiono odpowiednie kombinacje wyników czterech analiz na podstawie wyników uzyskanych w trzech pierwszych analizach przedstawionych w ramce powyżej.

Kryteria dopuszczalności

22. Podczas wykonywania badania U-SENS™ spełnione muszą zostać następujące kryteria dopuszczalności (12):

— pod koniec 45 ± 3-godzinnego okresu narażenia na działanie substancji chemicznej średnia żywotność komórek linii U937 niepoddanych działaniu substancji chemicznej w trzech kontrpróbach musiała wynosić >90 % i nie dopuszcza się możliwości zaobserwowania zniesienia ekspresji CD86. Podstawowa ekspresja CD86 w komórkach linii U937 niepoddanych działaniu substancji chemicznej musiała zawierać się w zakresie od ≥ 2 % do ≤25 %;

▼M8

— w przypadku stosowania sulfotlenku dimetylu jako rozpuszczalnika zasadność przeprowadzenia kontroli z nośnikiem zawierającej sulfotlenek dimetylu ocenia się, obliczając wartość wskaźnika stymulacji sulfotlenku dimetylu w porównaniu z komórkami niepoddanymi działaniu substancji chemicznej, a średnia żywotność komórek w trzech kontrpróbach musi wynosić >90 %. kontrola z nośnikiem zawierająca sulfotlenek dimetylu jest właściwa, jeżeli średnia wartość wskaźnika stymulacji CD86 w trzech kontrpróbach tej kontroli była mniejsza niż 250 % średniej wartości wskaźnika stymulacji CD86 komórek linii U937 niepoddanych działaniu substancji chemicznej w trzech kontrpróbach;

— analizy uznaje się za ważne, jeżeli co najmniej dwie z trzech wartości IgG1 komórek linii U937 niepoddanych działaniu substancji chemicznej mieszczą się w przedziale od ≥0,6 % do <1,5 %;

— równolegle badaną kontrolę ujemną (kwas mlekowy) uważa się za ważną, jeżeli w co najmniej dwóch z trzech kontrprób uzyskano wyniki ujemne (wskaźnik stymulacji CD86 <150 %) i nie odnotowano cytotoksyczności (żywotność komórek ≥70 %);

— kontrolę dodatnią (TNBS) uznano za ważną, jeżeli w co najmniej dwóch z trzech kontrprób uzyskano wyniki dodatnie (wskaźnik stymulacji CD86 ≥150 %) i nie odnotowano cytotoksyczności (żywotność komórek ≥70 %).

Sprawozdanie z badania

23. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

Substancja jednoskładnikowa

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w kompletnym podłożu, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— badane stężenie(-a);

— warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina:

— opisana w miarę możliwości np. poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, przedstawienie informacji dotyczących występowania ilościowego oraz wskazanie istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej), w dostępnym zakresie;

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w kompletnym podłożu, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;

— masa cząsteczkowa lub pozorna masa cząsteczkowa w przypadku mieszanin lub polimerów o znanym składzie lub inne informacje istotne dla przebiegu badania;

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— badane stężenie(-a);

— warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

▼**M8**

Kontrole

Kontrola dodatnia

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie i w stosownych przypadkach;

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— badane stężenie(-a);

— warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;

— odniesienie do wyników historycznych kontroli dodatnich wykazujących odpowiednie kryteria dopuszczalności analizy, w stosownych przypadkach.

Kontrola ujemna oraz kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— wygląd fizyczny, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne w przypadku stosowania innego rozpuszczalnika/nośnika kontrolnego niż te opisane w wytycznej dotyczącej badań, w dostępnym zakresie;

— warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Warunki badania

— nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań;

— opis zastosowanego badania;

— zastosowana linia komórkowa, warunki jej przechowywania oraz źródło (np. placówka, z której ją otrzymano);

— zastosowana cytometria przepływowa (np. model), w tym informacje na temat zastosowanych ustawień przyrządu, przeciwciał i markera cytotoksyczności;

— procedura stosowana w celu wykazania biegłości laboratorium w zakresie przeprowadzania badania poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości lub procedura stosowana do wykazania odtwarzalności badania w czasie, np. dane historyczne dotyczące kontroli lub dane historyczne dotyczące kontroli reaktywności.

Kryteria dopuszczalności badania

— wartości dotyczące żywotności komórek oraz wskaźnika stymulacji CD86 uzyskane za pomocą kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem w porównaniu z zakresami dopuszczalności;

▼M8

— wartości dotyczące żywotności komórek oraz wskaźnika stymulacji uzyskane za pomocą kontroli dodatniej w porównaniu z zakresami dopuszczalności;

— żywotność komórek przy wszystkich badanych stężeniach badanej substancji chemicznej.

Procedura badawcza

— liczba zastosowanych analiz;

— stosowane stężenia badanej substancji chemicznej, procedura podawania badanej substancji chemicznej i czas narażenia (jeżeli są one inne niż zalecane);

— czas narażenia na działanie substancji chemicznej;

— opis zastosowanych kryteriów oceny i podejmowania decyzji;

— opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej.

Wyniki

— tabelaryczne zestawienie danych, w tym wartości CV70 (w stosownych przypadkach), wskaźnika stymulacji, wartości żywotności komórek, wartości EC150 (w stosownych przypadkach), uzyskanych w odniesieniu do badanej substancji chemicznej oraz kontroli dodatniej w każdej analizie oraz wskazanie oceny badanej substancji chemicznej według modelu prognozowania;

— w stosownych przypadkach opis wszelkich innych istotnych obserwacji.

Omówienie wyników

— omówienie wyników uzyskanych za pomocą badania U-SENS™;

— uwzględnienie wyników zastosowania badania w kontekście IATA, jeżeli są dostępne inne odpowiednie informacje.

Wnioski

BIBLIOGRAFIA

(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 UE (2017). Sprawozdanie z badania walidacyjnego metody badawczej U-SENS™. Dostępne na stronie internetowej: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Dostępne na stronie internetowej: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Dostępne na stronie internetowej: 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. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: 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, 1 683–1 696.

(11) OECD. (2018). Projekt wytycznych: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf

(12) DB-ALM (2016). (protokół nr 183) Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Dostępne na stronie internetowej: [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). Seria dotycząca badań i oceny nr 34. Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm

(15) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2015). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, wydanie szóste zmienione, Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf

(16) OECD (2012). Seria dotycząca badań i oceny nr 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm

(17) ECETOC (2003). Sprawozdanie techniczne nr 87: Contact sensitization: Classification according to potency. Europejskie Centrum ds. Ekotoksykologii i Toksykologii Substancji Chemicznych, Bruksela. Dostępne na stronie internetowej: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼M8

Dodatek 2.1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności pomiędzy wynikami badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy przeprowadzeniu badania (14).

Mechanizm wywoływania skutków szkodliwych: sekwencja zdarzeń, począwszy od struktury chemicznej docelowej substancji chemicznej lub grupy podobnych substancji chemicznych poprzez molekularne zdarzenie inicjujące aż do pożądanego wyniku *in vivo* (15).

Zależność stężenie-odpowiedź w odniesieniu do CD86: zależność od stężenia (lub zależność stężenie-odpowiedź) występuje wówczas, gdy po uzyskaniu stężenia dodatniego (wskaźnik stymulacji CD86 ≥150) następuje stężenie charakteryzujące się wzrastającą wartością wskaźnika stymulacji CD86.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

CV70: szacowane stężenie, przy którym żywotność komórek wynosi 70 %.

Zniesienie: zniesienie ma miejsce, gdy (i) skorygowana wartość odsetka komórek $CD86^+$ w kontrpróbie stanowiącej próbę kontrolną niepoddawaną działaniu substancji nr 3 jest mniejsza niż 50 % średniej skorygowanej wartości odsetka komórek $CD86^+$ w kontrpróbach stanowiących próbę kontrolną niepoddawaną działaniu substancji nr 1 i 2; oraz (ii) skorygowana wartość odsetka komórek $CD86^+$ w kontrpróbie stanowiącej kontrolę ujemną nr 3 jest mniejsza niż 50 % średniej skorygowanej wartości odsetka komórek $CD86^+$ w kontrpróbach stanowiących kontrolę ujemną nr 1 i 2.

EC150: szacowane stężenia, przy których wskaźnik stymulacji ekspresji CD86 wynosi 150 %.

Cytometria przepływowa: technika cytometryczna, w której komórki zawieszone w cieczy przepływają jedna po drugiej przez zogniskowaną wiązkę wzbudzającego światła, które rozprasza się według wzorców charakterystycznych dla komórek i ich składników; komórki często oznacza się znacznikami fluorescencyjnymi, dzięki czemu światło jest najpierw absorbowane, a następnie emitowane w zmienionych częstotliwościach.

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub)populacji na taki czynnik.

IATA (zintegrowane podejście do badań i oceny): usystematyzowane podejście stosowane w odniesieniu do identyfikacji zagrożeń (potencjał), charakterystyki zagrożeń (siła oddziaływania) lub oceny bezpieczeństwa (potencjał / siła oddziaływania oraz narażenie) substancji chemicznej lub grupy substancji chemicznych; w ramach tego podejścia w sposób strategiczny integruje się i waży wszystkie istotne dane, które mogą wpłynąć na podjęcie decyzji regulacyjnej dotyczącej potencjalnego zagrożenia, ryzyka lub konieczności podjęcia dalszych ukierunkowanych, a przez to minimalnych badań.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji.

Substancja jednoskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

Substancja wieloskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu ≥10 % (w/w) i < 80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się poprzez zmieszanie przynajmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

▼M8

Kontrola dodatnia: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, stopień reakcji dodatniej nie powinien być nadmierny.

Prehapteny: substancje chemiczne, które stają się czynnikami uczulającymi po transformacji abiotycznej, np. poprzez utlenianie.

Prohapteny: substancje chemiczne, które wymagają aktywacji enzymatycznej do uwolnienia swojego potencjalnego działania uczulającego na skórę.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) badania (14).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim badanie może zostać przeprowadzone w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jego przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną (14).

Analiza: analiza obejmuje jednoczesne badanie jednej badanej substancji chemicznej lub większej liczby takich substancji w kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem i kontroli dodatniej.

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danego badania. Jest to miara dokładności badania, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności badania (14).

S.I.: wskaźnik stymulacji. Wartości względne średniej geometrycznej intensywności fluorescencji w komórkach poddanych działaniu substancji chemicznej w porównaniu z komórkami poddanymi działaniu rozpuszczalnika.

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego z wyjątkiem badanej substancji chemicznej, ale z uwzględnieniem stosowanego rozpuszczalnika/nośnika. Wykorzystywana jest do określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej lub stabilnie rozproszonej w tym samym rozpuszczalniku/nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą podłoża próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik/nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności badania, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności badania (14).

Roztwór buforowy do wybarwiania: roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami zawierający 5 % cielęcej surowicy płodowej.

Substancja: pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania jego trwałości i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem ewentualnych rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszego badania.

▼M8

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (16).

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

Ważne badanie: badanie, które uznano za wystarczająco istotne i wiarygodne dla danego celu i które opiera się na uzasadnionych naukowo podstawach. Badanie nie może zostać uznane za ważne w sensie absolutnym, ale tylko w odniesieniu do określonego celu (14).

▼M8

Dodatek 2.2

SUBSTANCJE SŁUŻĄCE DO WYKAZANIA BIEGŁOŚCI

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania opisanego w niniejszym dodatku do metody badawczej B.71 laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo określając prognozę U-SENS™ dla 10 substancji wskazanych w tabeli 1 oraz określając wartości CV70 i EC150, które mieszczą się w odpowiednim zakresie odniesienia, dla co najmniej 8 z 10 substancji służących do wykazania biegłości. Substancje służące do wykazania biegłości wybrano w taki sposób, aby odzwierciedlić zakres reakcji na zagrożenia związane z działaniem uczulającym na skórę. Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz dostępnością wysokiej jakości danych *in vitro* uzyskanych w wyniku zastosowania badania U-SENS™. W odniesieniu do badania U-SENS™ można znaleźć również opublikowane dane referencyjne (1)(8).

Tabela 1

Substancje zalecane do wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do badania U-SENS™

Substancje służące do wykazania biegłości	Numer CAS	Stan skupienia	Prognoza *in vivo* [1]	U-SENS Rozpuszczalnik/nośnik	U-SENS CV70 odniesienia CV70 w µg/ml [2]	U-SENS Zakres odniesienia EC150 w µg/ml [2]
4-fenylenodiamina	106-50-3	Stały	Czynnik uczulający (silny)	Kompletne podłoże [3]	<30	Dodatni (≤10)
Kwas pikrylosulfonowy	2508-19-2	Ciekły	Czynnik uczulający (silny)	Kompletne podłoże	>50	Dodatni (≤50)
Maleinian dietylu	141-05-9	Ciekły	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	sulfotlenek dimetylu	10-100	Dodatni (≤20)
Rezorcynol	108-46-3	Stały	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	Kompletne podłoże	>100	Dodatni (≤50)
Alkohol cynamonowy	104-54-1	Stały	Czynnik uczulający (słaby)	sulfotlenek dimetylu	>100	Dodatni (10–100)
4-allilamizol	140-67-0	Ciekły	Czynnik uczulający (słaby)	sulfotlenek dimetylu	>100	Dodatni (<200)
Sacharyna	81-07-2	Stały	Brak działania uczulającego	sulfotlenek dimetylu	>200	Ujemny (>200)
Glicerol	56-81-5	Ciekły	Brak działania uczulającego	Kompletne podłoże	>200	Ujemny (>200)
Kwas mlekowy	50-21-5	Ciekły	Brak działania uczulającego	Kompletne podłoże	>200	Ujemny (>200)
Kwas salicylowy	69-72-7	Stały	Brak działania uczulającego	sulfotlenek dimetylu	>200	Ujemny (>200)

Skróty: Nr CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service.

[1] Prognoza zagrożenia (i siły działania) *in vivo* jest oparta na danych z badania LLNA (1)(8). Siłę działania *in vivo* określa się na podstawie kryteriów zaproponowanych przez ECETOC (17).

[2] Na podstawie historycznych wartości zaobserwowanych (1)(8).

[3] Kompletne podłoże: podłoże RPMI-1640 z dodatkiem 10 % cielęcej surowicy płodowej, 2 mM L-glutaminy, 100 jednostek/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny (8).

▼**M8**

Dodatek 3

BADANIE DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO*: TEST IL-8 LUC

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

1. W przeciwieństwie do analiz, które mają na celu zbadanie ekspresji markerów powierzchniowych komórki, test IL-8-Luc pozwala określić ilościowo zmiany ekspresji IL-8 – cytokiny związanej z aktywacją komórek dendrytycznych. Ekspresję IL-8 w linii komórek reporterowych IL-8 wywodzącej się z THP-1 (THP-G8, ustanowionej z ludzkiej linii komórkowej ostrej białaczki monocytarnej THP-1) mierzy się po narażeniu na działanie czynników uczulających (1). Następnie ekspresję lucyferazy wykorzystuje się do ułatwienia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania.

2. Test IL-8 Luc oceniono w ramach badania walidacyjnego (2) przeprowadzonego przez Japońskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (JaCVAM), **Ministerstwo Gospodarki, Handlu i Przemysłu** (METI) i Japońskie Towarzystwo ds. **Metod Alternatywnych wobec Eksperymentów na Zwierzętach (JSAAE**), a następnie poddano niezależnej wzajemnej ocenie (3) pod auspicjami JaCVAM i Ministerstwa Zdrowia, Pracy i Opieki Społecznej (MHLW) przy wsparciu **międzynarodowej współpracy w zakresie alternatywnych metod badań** (ICATM). Biorąc pod uwagę wszystkie dostępne dowody oraz wkład ze strony organów regulacyjnych i zainteresowanych stron, można stwierdzić, że test IL-8 Luc jest przydatnym narzędziem w ramach IATA, pozwalającym rozróżnić substancje działające uczulająco na skórę i substancje niewykazujące takiego działania na potrzeby klasyfikacji i oznakowania pod względem zagrożeń. Przykłady wykorzystania danych z testu IL-8 Luc w połączeniu z innymi informacjami są opisane w literaturze (4)(5)(6).

3. Udowodniono, że test IL-8 Luc można przeprowadzać również w laboratoriach posiadających doświadczenie w zakresie kultury komórkowej i pomiaru lucyferazy. Odtwarzalność wyników w badaniu porównawczym wewnątrz- i międzylaboratoryjnym wynosiła odpowiednio 87,7 % i 87,5 % (2). Z danych uzyskanych w badaniu walidacyjnym (2) i innych opublikowanych pracach (1)(6) wynika, że – w porównaniu z LLNA – w teście IL-8 Luc wynik dodatni lub ujemny przypisano 118 spośród 143 substancji chemicznych, a 25 substancjom chemicznym przypisano wynik niejednoznaczny, przy czym dokładność testu IL-8 Luc w rozróżnianiu substancji działających uczulająco na skórę (należących do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania (należących do kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) wynosi 86 % (101/118) przy czułości na poziomie 96 % (92/96) i swoistości na poziomie 41 % (9/22). Wyłączając substancje znajdujące się poza dziedziną zastosowania opisaną poniżej (pkt 5), w teście IL-8 Luc wynik dodatni lub ujemny przypisano 113 spośród 136 substancji chemicznych, a 23 substancjom chemicznym przypisano wynik niejednoznaczny, przy czym dokładność testu IL-8 Luc wynosi 89 % (101/113) przy czułości na poziomie 96 % (92/96) i swoistości na poziomie 53 % (9/17). Wykorzystując dane dotyczące ludzi przytoczone przez Urbisch *et al.* (7), w teście IL-8 Luc wynik dodatni lub ujemny przypisano 76 spośród 90 substancji chemicznych, a 14 substancjom chemicznym przypisano wynik niejednoznaczny, przy czym dokładność testu wynosi 80 % (61/76), czułość – 93 % (54/58), a swoistość – 39 % (7/18). Wyłączając substancje znajdujące się poza dziedziną zastosowania, w teście IL-8 Luc wynik dodatni lub ujemny przypisano 71 spośród 84 substancji chemicznych, a 13 substancjom chemicznym przypisano wynik niejednoznaczny, przy czym dokładność testu wynosi 86 % (61/71) przy czułości na poziomie 93 % (54/58) i swoistości na poziomie 54 % (7/13). Prawdopodobieństwo wystąpienia prognoz fałszywie ujemnych przy zastosowaniu testu IL-8 Luc jest większe w przypadku substancji chemicznych wykazujących niską/średnią siłę działania uczulającego na skórę (tj. należących do podkategorii 1B wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) niż w przypadku substancji wykazujących wysoką siłę działania uczulającego (tj. należących do podkategorii 1A wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) (6). Łącznie informacje te łącznie wspierają rolę, jaką test IL-8 Luc odgrywa w identyfikacji zagrożeń związanych z działaniem uczulającym na skórę. Dokładność

▼**M8**

testu IL-8 Luc podana jako dokładność samodzielnego badania ma wyłącznie charakter orientacyjny, ponieważ test należy rozpatrywać w połączeniu z innymi źródłami informacji w kontekście IATA oraz zgodnie z przepisami pkt 7 i 8 wprowadzenia ogólnego. Co więcej, przy ocenie badań niewymagających wykorzystania zwierząt pod kątem działania uczulającego na skórę należy pamiętać, że LLNA, jak również inne badania przeprowadzane na zwierzętach, mogą nie w pełni odzwierciedlać sytuację w odniesieniu do ludzi.

4. Na podstawie obecnie dostępnych danych wykazano, że test IL-8 Luc ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych obejmujących szereg organicznych grup funkcyjnych, mechanizmów reagowania, sił działania uczulającego na skórę (jak określono w badaniach *in vivo*) oraz właściwości fizykochemicznych (2)(6).

5. Mimo że w teście IL-8 Luc jako rozpuszczalnik wykorzystuje się X-VIVOTM 15, przy użyciu tego testu poprawnie oceniono substancje chemiczne, których log K_{ow} wynosi > 3,5, oraz te, których rozpuszczalność w wodzie wynosi około 100 µg/ml, zgodnie z obliczeniami przy użyciu EPI Suite™, a jego skuteczność w wykrywaniu substancji działających uczulająco słabo rozpuszczalnych w wodzie jest lepsza niż w przypadku testu IL-8 Luc, w którym jako rozpuszczalnik wykorzystuje się sulfotlenek dimetylu (2). Wyniki ujemne uzyskane w odniesieniu do badanych substancji chemicznych, które nie rozpuszczają się w stężeniu 20 mg/ml, mogą jednak dawać wyniki fałszywie ujemne, ponieważ substancje te nie rozpuszczają się w X-VIVO™ 15. Dlatego też nie należy brać pod uwagę wyników ujemnych uzyskanych w odniesieniu do tych substancji chemicznych. Wysoki odsetek wyników fałszywie ujemnych w przypadku bezwodników zaobserwowano w badaniu walidacyjnym. Ponadto z powodu ograniczonej wydolności metabolicznej linii komórkowej (8) i warunków doświadczalnych prohapteny (substancje wymagające aktywacji metabolicznej) i prehapteny (substancje aktywowane przez utlenianie przy użyciu powietrza) mogą dawać w przedmiotowym teście wyniki ujemne. Chociaż wyniki ujemne uzyskane w odniesieniu do substancji, które mogą być pre-/prohaptenami, należy jednak interpretować z pewną dozą ostrożności, w teście IL-8 Luc prawidłowo oceniono jednak 11 spośród 11 prehaptenów, 6/6 prohaptenów i 6/8 pre-/prohaptenów znajdujących się w zestawie danych testu IL-8 Luc (2). Na podstawie najnowszego kompleksowego przeglądu trzech badań niewymagających wykorzystania zwierząt (DPRA, KeratinoSens™ i h-CLAT) przeprowadzonych w celu wykrycia pre- i prohaptenów (9) oraz w oparciu o fakt, że komórki THP-G8 wykorzystywane w teście IL-8 Luc są linią komórkową wywodzącą się z THP-1, którą wykorzystuje się w badaniu h-CLAT, można stwierdzić, że test IL-8 Luc – w połączeniu z innymi badaniami – może również przyczynić się do zwiększenia czułości badań niewymagających wykorzystania zwierząt pod względem wykrywania pre- i prohaptenów. Dotychczas badane środki powierzchniowo czynne dały wyniki (fałszywie) dodatnie niezależnie od ich rodzaju (np. kationowe, anionowe lub niejonowe). Ponadto substancje chemiczne zakłócające działanie lucyferazy mogą zakłócać jej aktywność/pomiar, powodując inhibicję pozorną lub zwiększoną luminescencję (10). Na przykład z dostępnych informacji wynika, że stężenia fitoestrogenu wyższe niż 1 µM zakłócają sygnały luminescencyjne w innych badaniach genów reporterowych opartych na lucyferazie z powodu nadaktywacji lucyferazowego genu reporterowego. W rezultacie należy ostrożnie badać ekspresję lucyferazy uzyskaną przy wysokich stężeniach fitoestrogenów lub związków, co do których przypuszcza się, że wywołują one – podobnie jak fitoestrogeny – aktywację lucyferazowego genu reporterowego (11). W związku z powyższym środki powierzchniowo czynne, bezwodniki oraz substancje chemiczne zakłócające funkcjonowanie działania lucyferazy znajdują się poza dziedziną zastosowania niniejszego testu. W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania testu IL-8 Luc w odniesieniu do innych konkretnych kategorii badanych substancji chemicznych, testu nie należy stosować w odniesieniu do tych konkretnych kategorii.

6. Jak opisano powyżej, test IL-8 Luc wspiera rozróżnienie substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania. Wymagane jest jednak przeprowadzenie dalszych prac, najlepiej na podstawie danych dotyczących ludzi, aby ustalić, w jaki sposób wyniki IL-8 Luc mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania, jeżeli są rozpatrywane w połączeniu z innymi źródłami informacji.

▼M8

7. Definicje znajdują się w dodatku 3.1.

ZASADA BADANIA

8. W teście IL-8 Luc wykorzystuje się ludzką linię komórkową białaczki monocytarnej THP-1, którą otrzymano ze zbioru kultur typu amerykańskiego (Manassas, Wirginia, Stany Zjednoczone). Wydział dermatologii szkoły medycznej Uniwersytetu Tokohu, wykorzystując tę linię komórkową, ustanowił linię komórek reporterowych IL-8 wywodzącą się z THP-1 – THP-G8, która zawiera geny stabilnej lucyferazy pomarańczowej (SLO) i stabilnej lucyferazy czerwonej (SLR), kontrolowane odpowiednio przez promotory IL-8 oraz **dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego** (GAPDH) (1). Pozwala to na dokonanie ilościowego pomiaru indukcji genu lucyferazy przy wykryciu luminescencji z powszechnie stosowanych substratów lucyferazy generujących światło jako wskaźnika aktywności IL-8 i GAPDH w komórkach, które zostały narażone na działanie substancji działających uczulająco.

9. System testu uwzględniającego dwie barwy zawiera lucyferazę emitującą światło pomarańczowe (SLO; λmaks. = 580 nm) (12) na potrzeby ekspresji genów promotora IL-8, a także lucyferazę emitującą światło czerwone (SLR; λmaks. = 630 nm) (13) na potrzeby ekspresji genów promotora kontroli wewnętrznej – GAPDH. Te dwie lucyferazy emitują różne barwy w reakcji z d-lucyferyną świetlika, a ich luminescencję mierzy się jednocześnie w reakcji jednoetapowej, wykorzystując filtr optyczny do oddzielenia emisji od mieszaniny testowej (14) (dodatek 3.2).

10. Komórki THP-G8 poddaje się działaniu substancji chemicznej przez 16 godzin, po czym mierzy się aktywność lucyferazy SLO (SLO-LA) odzwierciedlającą aktywność promotora IL-8 oraz aktywność lucyferazy SLR (SLR-LA) odzwierciedlającą aktywność promotora GAPDH. Aby ułatwić zrozumienie skrótów, SLO-LA i SLR-LA wyznaczono odpowiednio jako IL8LA i GAPLA. W tabeli 1 przedstawiono opis pojęć związanych z aktywnością lucyferazy w teście IL-8 Luc. Zmierzone wartości wykorzystuje się do obliczenia: znormalizowanej IL8LA (nIL8LA), która jest stosunkiem IL8LA do GAPLA; indukcji nIL8LA (Ind-IL8LA), która jest stosunkiem średnich arytmetycznych czterokrotnie mierzonych wartości nIL8LA komórek THP-G8 poddanych działaniu substancji chemicznej oraz wartości nIL8LA komórek THP-G8 niepoddanych działaniu substancji chemicznej; oraz inhibicji GAPLA (Inh-GAPLA), która jest stosunkiem średnich arytmetycznych czterokrotnie mierzonych wartości GAPLA komórek THP-G8 poddanych działaniu substancji chemicznej i wartości GAPLA komórek THP-G8 niepoddanych działaniu substancji chemicznej, a także jako wskaźnik cytotoksyczności.

Tabela 1

Opis pojęć związanych z aktywnością lucyferazy w teście IL-8 Luc

Skrót	Definicja
GAPLA	Aktywność lucyferazy SLR odzwierciedlająca aktywność promotora GAPDH
IL8LA	Aktywność lucyferazy SLO odzwierciedlająca aktywność promotora IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA komórek THP-G8 poddanych działaniu substancji chemicznych / nIL8LA komórek niepoddanych działaniu substancji chemicznych

▼M8

Skrót	Definicja
Inh-GAPLA	GAPLA komórek THP-G8 poddanych działaniu substancji chemicznych / GAPLA komórek niepoddanych działaniu substancji chemicznych
CV05	Najniższe stężenie substancji chemicznej, w którym Inh-GAPLA przyjmuje wartość < 0,05.

11. Aby usprawnić proces walidacji zmienionych testów *in vitro* lucyferazy IL-8 podobnych do testu IL-8 Luc i aby umożliwić terminowe modyfikowanie wytycznej OECD nr 442E dotyczącej badań, można skorzystać z dostępnych standardów wykonywania badań (15). Wzajemne uznawanie danych OECD będzie możliwe wyłącznie w przypadku badań zweryfikowanych zgodnie ze standardem wykonywania badań, jeżeli badania te poddano przeglądowi i włączono do wytycznej OECD nr 442E dotyczącej badań (16).

WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

12. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania opisanego w niniejszym dodatku do metody badawczej B.71 laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną z zastosowaniem dziesięciu substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 3.3 zgodnie z dobrymi praktykami w zakresie metody *in vitro* (17). Ponadto użytkownicy badania powinni prowadzić bazę danych historycznych wygenerowanych podczas kontroli reaktywności (zob. pkt 15) oraz kontroli dodatnich i kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem (zob. pkt 21–24), a także wykorzystywać te dane do potwierdzenia zachowania odtwarzalności badania w swoim laboratorium w miarę upływu czasu.

PROCEDURA

13. Standardowa procedura operacyjna dotycząca testu IL-8 Luc jest dostępna i należy z niej korzystać podczas przeprowadzania badania (18). Laboratoria, które chcą przeprowadzić badanie, mogą otrzymać rekombinowaną linię komórkową THP-G8 w laboratorium GPC Co. Ltd. w Tottori w Japonii, podpisując, w zgodzie z warunkami wzoru OECD, porozumienie o transferze materiału. W poniższych punktach opisano najistotniejsze elementy i procedury związane z testem.

Przygotowanie komórek

14. Do przeprowadzenia testu IL-8 Luc (zob. pkt 8 i 13) należy wykorzystaćlinię komórkową THP-G8 pochodzącą z laboratorium GPC Co. Ltd. w Tottori w Japonii. Po odebraniu komórki rozmnaża się (2–4 pasaży) i przechowuje zamrożone jako jednorodny zbiór. Komórki pochodzące z tego zbioru można rozmnażać do osiągnięcia maksymalnie 12 pasaży lub przez maksimum 6 tygodni. RPMI-1640 jest podłożem wykorzystywanym do rozmnażania, zawierającym 10 % bydlęcej surowicy płodowej (FBS), roztwór antybiotyczny/przeciwgrzybiczy (100 U/ml penicyliny G, 100 µg/ml streptomycyny i 0,25 µg/ml amfoterycyny B w 0,85 % soli fizjologicznej) (np. GIBCO o numerze kat. 15240-062), 0,15 µg/ml puromycyny (np. nr CAS 58-58-2) oraz 300 µg/ml G418 (np. nr CAS 108321-42-2).

15. Przed wykorzystaniem komórek do badań należy je zakwalifikować, przeprowadzając kontrolę reaktywności. Kontrolę tę należy przeprowadzić w terminie 1–2 tygodni lub 2–4 pasaży po rozmrożeniu, stosując kontrolę dodatnią, tj. bromek 4-nitrobenzylu (4-NBB) (nr CAS 100-11-8, czystość ≥ 99 %), oraz kontrolę ujemną, tj. kwas mlekowy (LA) (nr CAS 50-21-5, czystość ≥ 85 %). Bromek 4-nitrobenzylu powinien wywołać reakcję dodatnią na Ind-IL8LA (≥1,4), natomiast kwas mlekowy powinien wywołać reakcję ujemną na Ind-IL8LA (<1,4). W teście należy wykorzystać wyłącznie te komórki, które pomyślnie przeszły kontrolę reaktywności. Kontrolę reaktywności należy przeprowadzić zgodnie z procedurami opisanymi w pkt 22–24.

▼M8

16. Komórki THP-G8 wysiewa się do badań w gęstości 2–5 × 10^5 komórek/ml i dokonuje ich wstępnej hodowli w kolbach z kulturami przez 48–96 godzin. W dniu badania komórki pobrane z kolb z kulturami przemywa się w podłożu RPMI-1640 zawierającym 10 % FBS bez antybiotyków, a następnie zawiesza się je ponownie w podłożu RPMI-1640 o zawartości 10 % FBS bez antybiotyków w gęstości 1 × 10^6 komórek/ml. Następnie komórki umieszcza się w dołkach 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej (np. Costar o numerze kat. 3603) w objętości po 50 µl (5 × 10^4 komórek/ml).

Przygotowanie badanej substancji chemicznej i substancji kontrolnych

17. Badaną substancję chemiczną oraz substancje kontrolne przygotowuje się w dniu badania. Na potrzeby testu IL-8 Luc badane substancje chemiczne rozpuszcza się w X-VIVO™ 15, dostępnym na rynku podłożu pozbawionym surowicy (Lonza, 04-418Q), do stężenia końcowego wynoszącego 20 mg/ml. W probówce do mikrowirówki do 20 mg badanej substancji chemicznej (bez względu na rozpuszczalność tej substancji chemicznej) dodaje się X-VIVO™ 15 aż do uzyskania objętości 1 ml, a następnie przez 30 min energicznie wiruje i wstrząsa na wirniku przy maksymalnej prędkości wynoszącej 8 obr./min w temperaturze otoczenia wynoszącej ok. 20 °C. W przypadku gdy stałe substancje chemiczne wciąż są nierozpuszczalne, probówkę dodatkowo poddaje się działaniu ultradźwięków do momentu całkowitego rozpuszczenia substancji chemicznej lub utworzenia jej stabilnej dyspersji. W przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczalnych w X-VIVO™ 15 roztwór rozcieńcza się pięciokrotnie za pomocą X-VIVO™ 15 i wykorzystuje jako roztwór podstawowy X-VIVO™ 15 badanej substancji chemicznej (4 mg/ml). W przypadku badanych substancji chemicznych nierozpuszczalnych w X-VIVO™ 15 mieszaninę ponownie wiruje się przez co najmniej 30 minut, a następnie odwirowuje z prędkością 15000 obr./min. (≈20000 *g*) przez 5 min; powstały supernatant wykorzystuje się jako roztwór podstawowy X-VIVO™ 15 badanej substancji chemicznej. W przypadku zastosowania innych rozpuszczalników, takich jak sulfotlenek dimetylu, woda lub podłoże, należy przedstawić uzasadnienie naukowe. W dodatku 3.5 szczegółowo opisano procedurę rozpuszczania substancji chemicznych. Roztwory X-VIVO™ 15 opisane w pkt 18–23 miesza się w stosunku 1:1 (obj.) z zawiesinami komórkowymi przygotowanymi w dołkach 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej (zob. pkt 16).

18. Celem pierwszej analizy testowej jest określenie stężenia cytotoksycznego oraz zbadanie potencjału działania uczulającego na skórę substancji chemicznych. Przy pomocy X-VIVO™ 15 tworzy się serię rozcieńczeń w postępie geometrycznym roztworów podstawowych X-VIVO™ 15 badanych substancji chemicznych, stosując współczynnik rozcieńczenia wynoszący 2 (zob. dodatek 3.5) i wykorzystując do tego celu blok 96-dołkowy (np. Costar o numerze kat. EW-01729-03). Następnie do 50 µl zawiesiny komórkowej znajdującej się w dołkach 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej dodaje się rozcieńczony roztwór w objętości 50 µl/dołek. Dlatego też w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczalnych w X-VIVO™ 15 stężenia końcowe tych substancji wynoszą 0,002–2 mg/ml (dodatek 3.5). W przypadku badanych substancji chemicznych, które nie rozpuszczają się w X-VIVO ™ 15 w stężeniu 20 mg/ml, określa się jedynie współczynniki rozcieńczenia wynoszące 2–2^{10}, chociaż rzeczywiste stężenia końcowe badanych substancji chemicznych pozostają niepewne i zależą od stężenia roztworu nasyconego substancji chemicznych w roztworze podstawowym X-VIVO ™ 15.

19. W kolejnych analizach testowych (tj. w drugiej, trzeciej i czwartej kontrpróbie) roztwór podstawowy X-VIVO™ 15 tworzy się w stężeniu czterokrotnie wyższym niż stężenie, przy którym żywotność komórek wynosi 05 (CV05; najniższe stężenie, przy którym Inh-GAPLA przyjmuje wartość < 0,05) w pierwszym doświadczeniu. Jeżeli najwyższe stężenie Inh-GAPLA nie spadnie poniżej 0,05 w pierwszej analizie, roztwór podstawowy X-VIVO™ 15 tworzy się w najwyższym stężeniu użytym w pierwszej analizie. Stężenie CV05 oblicza się, dzieląc stężenie roztworu podstawowego uzyskanego podczas pierwszej analizy przez współczynnik rozcieńczenia CV05 (X) (współczynnik rozcieńczenia CV05 (X); współczynnik rozcieńczenia wymagany do rozcieńczenia roztworu podstawowego do CV05) (zob. dodatek 3.5). W przypadku badanych substancji nierozpuszczalnych w X-VIVO w stężeniu 20 mg/ml wartość CV05 określa się, mnożąc stężenie roztworu podstawowego przez 1/X. Jeżeli chodzi o analizy 2–4, przygotowuje się drugi roztwór podstawowy w postaci 4 × CV05 (dodatek 3.5).

▼**M8**

20. Serie rozcieńczeń w postępie geometrycznym drugich roztworów podstawowych X-VIVO™ 15 tworzy się, stosując współczynnik rozcieńczenia wynoszący 1,5 i wykorzystując do tego celu blok 96-dołkowy. Następnie do 50 µl zawiesiny komórkowej znajdującej się w dołkach 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej dodaje się rozcieńczony roztwór w objętości 50 µl/dołek. Każde stężenie badanej substancji chemicznej należy badać w czterech dołkach. Próbki miesza się wówczas za pomocą wytrząsarki do płytek i inkubuje przez 16 godzin w temperaturze 37 °C i w obecności 5 % CO_2, po czym mierzy się aktywność lucyferazy w sposób opisany poniżej.

21. Kontrola z rozpuszczalnikiem jest mieszaniną X-VIVO™ 15 w objętości 50 µl/dołek i zawiesiny komórkowej w RPMI-1640 zawierającej 10 % bydlęcej surowicy płodowej w objętości 50 µl/dołek.

22. Zalecaną kontrolą dodatnią jest bromek 4-nitrobenzylu. W 1,5-mililitrowej probówce do mikromiareczkowania przygotowuje się 20 mg bromku 4-nitrobenzylu, a następnie dodaje się X-VIVO™ 15 do uzyskania objętości 1 ml. Probówkę umieszcza się w wirniku, gdzie jej zawartość jest energicznie mieszana i wstrząsana z maksymalną prędkością 8 obr./min przez co najmniej 30 min. Po odwirowywaniu przy 20000 g przez 5 minut supernatant rozcieńcza się czterokrotnie w X-VIVO™ 15, a następnie 500 µl rozcieńczonego supernatantu przenosi się do dołka bloku 96-dołkowego. Rozcieńczony supernatant rozcieńcza się dalej w X-VIVO™ 15, stosując współczynniki rozcieńczenia 2 i 4, po czym 50 µl tego roztworu dodaje się do 50 µl zawiesiny komórkowej THP-G8 znajdującej się w dołkach 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej (dodatek 3.6). Każde stężenie kontroli dodatniej należy badać w czterech dołkach. Płytkę wstrząsa się za pomocą wytrząsarki do płytek i inkubuje w inkubatorze CO_2 (37 °C, 5 % CO_2) przez 16 godzin, po czym mierzy się aktywność lucyferazy w sposób opisany w pkt 29.

23. Zaleca się stosowanie kwasu mlekowego jako kontroli ujemnej. W 1,5-mililitrowej probówce do mikromiareczkowania przygotowuje się 20 mg kwasu mlekowego, a następnie dodaje się X-VIVO™ 15 do uzyskania objętości 1 ml (20 mg/ml). Roztwór kwasu mlekowego o stężeniu 20 mg/ml rozcieńcza się pięciokrotnie w X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl tego roztworu kwasu mlekowego o stężeniu 4 mg/ml przenosi się do dołka bloku 96-dołkowego. Roztwór ten rozcieńcza się dwukrotnie w X-VIVO™ 15, a następnie ponownie rozcieńcza się dwukrotnie, by uzyskać roztwory o stężeniach 2 mg/ml oraz 1 mg/ml. 50 µl tych trzech roztworów oraz kontrolę z nośnikiem (X-VIVO™ 15) dodaje się do 50 µl zawiesiny komórkowej THP-G8 znajdującej się w dołkach 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej. Każde stężenie kontroli ujemnej bada się w czterech dołkach. Płytkę wstrząsa się za pomocą wytrząsarki do płytek i inkubuje w inkubatorze CO_2 (37 °C, 5 % CO_2) przez 16 godzin, po czym mierzy się aktywność lucyferazy w sposób opisany w pkt 29.

24. Można stosować inne odpowiednie kontrole dodatnie lub ujemne, jeżeli dostępne są dane historyczne pozwalające na uzyskanie porównywalnych kryteriów dopuszczalności analizy.

25. Należy dołożyć starań, aby nie dopuścić do odparowania lotnych badanych substancji chemicznych i aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu między dołkami zawierającymi badane substancje chemiczne, np. szczelnie zaklejając płytkę przed rozpoczęciem inkubacji z wykorzystaniem badanych substancji chemicznych.

26. Uzyskanie prognozy dodatniej lub ujemnej w odniesieniu badanych substancji chemicznych oraz kontroli z rozpuszczalnikiem wymaga przeprowadzenia 2–4 analiz (zob. tabela 2). Każdą analizę przeprowadza się innego dnia, używając świeżego roztworu podstawowego X-VIVO™ 15 badanych substancji chemicznych oraz wykorzystując niezależnie pobrane komórki. Komórki mogą pochodzić z tego samego pasażu.

▼M8

Pomiary aktywności lucyferazy

27. Luminescencję mierzy się przy zużyciu 96-dołkowego luminometru mikropłytkowego wyposażonego w filtry optyczne, np. Phelios (ATTO, Tokio, Japonia), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Niemcy) oraz seria ARVO (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Aby zapewnić odtwarzalność, luminometr musi być wykalibrowany na potrzeby każdego badania (19). Na potrzeby tej kalibracji dostępne są rekombinowane lucyferazy emitujące światło pomarańczowe i czerwone.

28. 100µl podgrzanego odczynnika do testu lucyferazy Tripluc® (Tripluc) przenosi się do każdego dołka na płytce, który zawiera zawiesinę komórkową poddaną działaniu substancji chemicznej lub niepoddaną takiemu działaniu. Płytkę wstrząsa się przez 10 minut w temperaturze otoczenia wynoszącej ok. 20 ^{o}C. Umieszcza się ją w luminometrze, by zmierzyć aktywność lucyferazy. Bioluminescencję mierzy się każdorazowo przez 3 sekundy zarówno z zastosowaniem filtra optycznego (F1), jak i bez niego (F0). W przypadku zastosowania innych ustawień, np. z uwagi na korzystanie z innego modelu luminometru, należy przedstawić stosowne uzasadnienie.

29. Parametry każdego stężenia obliczane są na podstawie zmierzonych wartości, np. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, średniego odchylenia standardowego (±SD) IL8LA, średniego ±SD GAPLA, średniego ±SD nIL8LA, średniego ±SD Ind-IL8LA, średniego ±SD Inh-GAPLA oraz 95-procentowego przedziału ufności Ind-IL8LA. Definicje parametrów użytych w niniejszym punkcie znajdują się w dodatkach 3.1 oraz 3.4.

30. Przed pomiarem rozróżnienie kolorystyczne w testach reporterowych, w których stosuje się kilka barw, uzyskuje się zazwyczaj przy użyciu detektorów (luminometru oraz czytnika płytek) wyposażonych w filtry optyczne, takie jak filtry typu *sharp-cut* (długoprzepustowe lub krótkoprzepustowe) lub filtry środkowoprzepustowe. Zgodnie z dodatkiem 3.2 współczynniki transmisji filtrów każdego koloru sygnału bioluminescencji należy wykalibrować przed badaniem.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena danych

31. Zgodnie z kryteriami podejmowania decyzji stwierdzającej wynik dodatni/ujemny wymaga się, aby w każdej analizie:

— prognozę dotyczącą testu IL-8 Luc uznać za dodatnią, jeżeli Ind-IL8LA badanej substancji chemicznej wynosi ≥1,4 oraz gdy dolna wartość graniczna 95-procentowego przedziału ufności Ind-IL8LA wynosi ≥1,0;

— prognozę dotyczącą testu IL-8 Luc uznać za ujemną, jeżeli Ind-IL8LA badanej substancji chemicznej wynosi <1,4 lub gdy dolna wartość graniczna 95-procentowego przedziału ufności Ind-IL8LA wynosi <1,0.

Model prognozowania

32. Uznaje się, że badane substancje chemiczne, w odniesieniu do których uzyskano wyniki dodatnie w dwóch analizach spośród analiz pierwszej, drugiej, trzeciej lub czwartej, uzyskują wynik dodatni, natomiast substancje, w odniesieniu do których uzyskano wyniki ujemne w trzech analizach spośród analiz pierwszej, drugiej, trzeciej lub czwartej, uzyskują wynik przypuszczalnie ujemny (tabela 2). Spośród substancji chemicznych, w odniesieniu do których przypuszcza się, że uzyskają wynik ujemny, substancjom chemicznym, które rozpuściły się w X-VIVO^{TM} 15 w stężeniu 20 mg/ml, przyznaje się wynik ujemny, natomiast substancji chemicznych, które nie rozpuściły się w X-VIVO^{TM} 15 w stężeniu 20 mg/ml, nie należy brać pod uwagę (rys. 1).

▼M8

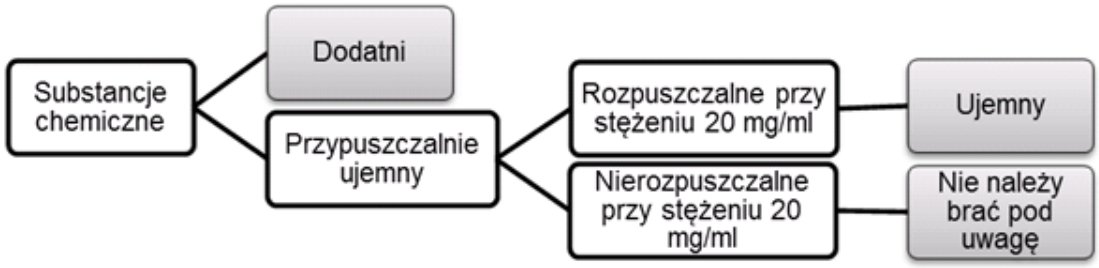
Tabela 2

Kryteria identyfikacji wyniku dodatniego i przypuszczalnie ujemnego

Analiza 1	Analiza 2	Analiza 3	Analiza 4	Prognoza końcowa
Dodatni	Dodatni	–	–	Dodatni
	Ujemny	Dodatni	–	Dodatni
		Ujemny	Dodatni	Dodatni
			Ujemny	Przypuszczalnie ujemny
Ujemny	Dodatni	Dodatni	–	Dodatni
		Ujemny	Dodatni	Dodatni
			Ujemny	Przypuszczalnie ujemny
	Ujemny	Dodatni	Dodatni	Dodatni
			Ujemny	Przypuszczalnie ujemny
		Ujemny	–	Przypuszczalnie ujemny

Rys. 1

Model prognozowania oceny końcowej



Kryteria dopuszczalności

33. Podczas wykonywania testu IL-8 Luc spełnione muszą zostać następujące kryteria dopuszczalności:

— w każdej analizie wartość Ind-IL8LA powinna wynosić powyżej 5,0 w co najmniej jednym stężeniu kontroli dodatniej, tj. bromku 4-nitrobenzylu;

— w każdej analizie wartość Ind-IL8LA powinna wynosić poniżej 1,4 w dowolnym stężeniu kontroli ujemnej, tj. kwasie mlekowym;

— należy odrzucić dane z płytek, w przypadku których wartość GAPLA dołków kontrolnych zawierających komórki i Tripluc, lecz niezawierających substancji chemicznych, jest mniejsza niż pięciokrotność wartości GAPLA dołków zawierających jedynie podłoże do badań (RPMI-1640 zawierające 10 % bydlęcej surowicy płodowej w objętości 50 µl/dołek i X-VIVO^{TM} 15 w objętości 50 µl/dołek);

— należy odrzucić dane z płytek, w przypadku których wartość Inh-GAPLA wszystkich stężeń badanych lub kontrolnych substancji chemicznych jest mniejsza niż 0,05. W tym przypadku należy powtórzyć pierwsze badanie, tak aby najwyższe stężenie końcowe powtórzonego badania było najniższym stężeniem końcowym poprzedniego badania.

▼M8

Sprawozdanie z badania

34. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badane substancje chemiczne

Substancja jednoskładnikowa:

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— rozpuszczalność w X-VIVO™ 15. w przypadku substancji chemicznych nierozpuszczalnych w X-VIVO™ 15 – czy po odwirowaniu można zaobserwować strącanie lub flotację;

— badane stężenie(-a);

— warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, jeśli nie wykorzystano X-VIVO™ 15.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina:

— opisana w miarę możliwości np. poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, przedstawienie informacji dotyczących występowania ilościowego oraz wskazanie istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej), w dostępnym zakresie;

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;

— masa cząsteczkowa lub pozorna masa cząsteczkowa w przypadku mieszanin lub polimerów o znanym składzie lub inne informacje istotne dla przebiegu badania;

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— rozpuszczalność w X-VIVO™ 15. w przypadku substancji chemicznych nierozpuszczalnych w X-VIVO™ 15 – czy po odwirowaniu można zaobserwować strącanie lub flotację;

— badane stężenie(-a);

— warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, jeśli nie wykorzystano X-VIVO™ 15.

Kontrole

Kontrola dodatnia:

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie i w stosownych przypadkach;

▼**M8**

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);

— badane stężenie(-a);

— warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;

— odniesienie do wyników historycznych kontroli dodatnich wykazujących odpowiednie kryteria dopuszczalności, w stosownych przypadkach.

Kontrola ujemna:

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS lub inne identyfikatory;

— czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

— wygląd fizyczny, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne w przypadku stosowania innych kontroli ujemnych niż te opisane w wytycznej dotyczącej badań, w dostępnym zakresie;

— warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Warunki badania

— nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań;

— opis zastosowanego badania;

— zastosowana linia komórkowa, warunki jej przechowywania oraz źródło (np. placówka, z której ją otrzymano);

— numer partii i pochodzenie bydlęcej surowicy płodowej, nazwa dostawcy, numer partii 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej oraz numer partii odczynnika Tripluc;

— liczba pasaży i gęstość komórek wykorzystanych do badań;

— metoda zliczania komórek zastosowana do posiewania przed badaniem i środki podjęte w celu zapewnienia jednorodnego rozmieszczenia liczby komórek;

— zastosowany luminometr (np. model), w tym ustawienia przyrządu, wykorzystany substrat lucyferazy oraz wykazanie odpowiednich pomiarów luminescencji w oparciu o badanie kontrolne opisane w dodatku 3.2;

— procedura stosowana w celu wykazania biegłości laboratorium w zakresie przeprowadzania badania (np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości) lub do wykazania odtwarzalności badania w czasie.

Procedura badawcza

— liczba zastosowanych kontrprób i wykonanych analiz;

— stosowane stężenia badanej substancji chemicznej, procedura podawania badanej substancji chemicznej i czas narażenia (jeżeli są one inne niż zalecane);

▼**M8**

— opis zastosowanych kryteriów oceny i podejmowania decyzji;

— opis zastosowanych kryteriów dopuszczalności badania;

— opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej.

Wyniki

— pomiary wartości IL8LA i GAPLA;

— obliczenia dotyczące nIL8LA, Ind-IL8LA i Inh-GAPLA;

— 95-procentowy przedział ufności Ind-IL8LA;

— wykres przedstawiający krzywe dawka-efekt w odniesieniu do indukcji aktywności lucyferazy i żywotności;

— w stosownych przypadkach opis wszelkich innych istotnych obserwacji.

Omówienie wyników

— omówienie wyników uzyskanych za pomocą testu IL-8 Luc;

— uwzględnienie wyników testu w kontekście IATA, jeżeli są dostępne inne odpowiednie informacje.

Wniosek

BIBLIOGRAFIA

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K i 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.* Seria dotycząca badań i oceny nr 267*, ENV/JM/MONO(2017)19,* Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: 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. Seria dotycząca badań i oceny nr 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: 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. Seria dotycząca badań i oceny nr 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: 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 i 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 i 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 i 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 i 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 i Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646–57.

(11) OECD (2016). *Badanie nr 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected TransactivationIn Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists,* Paryż: OECD Publishing. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M i 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 i 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 i 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). Przeznaczone do publikacji – Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny. Francja, Paryż: OECD.

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 34. Francja, Paryż: OECD.

(17) OECD (2018). Projekt wytycznych: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf

(18) JaCVAM (2016). Protokół z testu IL-8 Luc, dostępny na stronie internetowej: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR i 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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 168. Francja, Paryż: OECD.

(21) Organizacja Narodów Zjednoczonych (2015). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). wydanie szóste zmienione, Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

▼**M8**

Dodatek 3.1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności pomiędzy wynikami badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność" na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy przeprowadzeniu badania (16).

Mechanizm wywoływania skutków szkodliwych: sekwencja zdarzeń, począwszy od struktury chemicznej docelowej substancji chemicznej lub grupy podobnych substancji chemicznych poprzez molekularne zdarzenie inicjujące aż do pożądanego wyniku *in vivo* (20).

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

CV05: żywotność komórek 05, tj. minimalne stężenie, przy którym substancje chemiczne wykazują wartość Inh-GAPLA poniżej 0,05.

FInSLO-LA: skrót stosowany w sprawozdaniu z walidacji i we wcześniejszych publikacjach dotyczących testu IL-8 Luc w odniesieniu do Ind-IL8LA. Definicja – zob. Ind-IL8LA

GAPLA: aktywność stabilnej lucyferazy czerwonej (SLR) (λmaks. = 630 nm), regulowana przez promotor GAPDH oraz wykazująca żywotność komórek i liczbę komórek żywotnych.

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub)populacji na taki czynnik.

IATA (zintegrowane podejście do badań i oceny): usystematyzowane podejście stosowane w odniesieniu do identyfikacji zagrożeń (potencjał), charakterystyki zagrożeń (siła oddziaływania) lub oceny bezpieczeństwa (potencjał / siła oddziaływania oraz narażenie) substancji chemicznej lub grupy substancji chemicznych; w ramach tego podejścia w sposób strategiczny integruje się i waży wszystkie istotne dane, które mogą wpłynąć na podjęcie decyzji regulacyjnej dotyczącej potencjalnego zagrożenia, ryzyka lub konieczności podjęcia dalszych ukierunkowanych, a przez to minimalnych badań.

II-SLR-LA: skrót stosowany w sprawozdaniu z walidacji i we wcześniejszych publikacjach dotyczących testu IL-8 Luc w odniesieniu do Inh-GAPLA. Definicja – zob. Inh-GAPLA.

IL-8 (Interleukina-8): cytokina pozyskana z komórek śródbłonka, fibroblastów, keratynocytów, makrofagów i monocytów, która powoduje chemotaksję neutrofili i limfocytów T.

IL8LA: aktywność stabilnej lucyferazy pomarańczowej (SLO) (λmaks. = 580 nm), regulowana przez promotor IL-8.

Ind-IL8LA: krotność indukcji nIL8LA. Wartość tę uzyskuje się, dzieląc wartość nIL8LA komórek THP-G8 poddanych działaniu substancji chemicznych przez wartość nil8LA niestymulowanych komórek THP-G8; wartość Ind-IL8LA odzwierciedla indukcję aktywności promotora IL-8 przy pomocy substancji chemicznych.

Inh-GAPLA: inhibicja GAPLA. Wartość tę uzyskuje się, dzieląc wartość GAPLA komórek THP-G8 poddanych działaniu substancji chemicznych przez wartość GAPLA komórek THP-G8 niepoddanych działaniu substancji chemicznych; Inh-GAPLA odzwierciedla cytotoksyczność substancji chemicznych.

Minimalny próg indukcji: najniższe stężenie, przy którym substancja chemiczna spełnia kryteria uzyskania wyniku dodatniego.

▼M8

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji.

Substancja jednoskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

Substancja wieloskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu ≥10 % (w/w) i <80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się poprzez zmieszanie przynajmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

nIL8LA: aktywność lucyferazy SLO odzwierciedlająca aktywność promotora IL-8 (IL8LA), znormalizowana przez aktywność lucyferazy SLR odzwierciedlającą aktywność promotora GAPDH (GAPLA). Wartość nIL8LA odzwierciedla aktywność promotora IL-8 po uwzględnieniu żywotności komórek lub ich liczby.

nSLO-LA: skrót stosowany w sprawozdaniu z walidacji i we wcześniejszych publikacjach dotyczących testu IL-8 Luc w odniesieniu do nIL8LA. Definicja – zob. nIL8LA.

Kontrola dodatnia: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, stopień reakcji dodatniej nie powinien być nadmierny.

Prehapteny: substancje chemiczne, które stają się czynnikami uczulającymi po transformacji abiotycznej.

Prohapteny: substancje chemiczne, które wymagają aktywacji enzymatycznej do uwolnienia swojego potencjalnego działania uczulającego na skórę.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć biologiczny oczekiwany skutek. istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) badania (16).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim badanie może zostać przeprowadzone w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jego przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną (16).

Analiza: analiza obejmuje jednoczesne badanie jednej badanej substancji chemicznej lub większej liczby takich substancji w kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem i kontroli dodatniej.

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danego badania. Jest to miara dokładności badania, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności badania (16).

SLO-LA: skrót stosowany w sprawozdaniu z walidacji i we wcześniejszych publikacjach dotyczących testu IL-8 Luc w odniesieniu do IL8LA. Definicja – zob. IL8LA.

SLR-LA: skrót stosowany w sprawozdaniu z walidacji i we wcześniejszych publikacjach dotyczących testu IL-8 Luc w odniesieniu do GAPLA. Definicja – zob. GAPLA.

▼M8

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego z wyjątkiem badanej substancji chemicznej, ale z uwzględnieniem stosowanego rozpuszczalnika/nośnika. Wykorzystywana jest do określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej lub stabilnie rozproszonej w tym samym rozpuszczalniku/nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą podłoża próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik/nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności badania, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności badania (16).

Substancja: pierwiastki chemiczne i ich związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

Środek powierzchniowo czynny: zwany także surfaktantem, jest to substancja, np. detergent, która może zmniejszać napięcie powierzchniowe cieczy, umożliwiając tym samym jej pienienie lub przenikanie w ciała stałe; substancja ta jest także zwana środkiem zwilżającym. (TG437)

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody.

THP-G8: linia komórek reporterowych IL-8 wykorzystana w teście IL-8 Luc. Ludzką linię komórkową THP-1 typu makrofagowego poddano transfekcji przy użyciu genów lucyferazy SLO i SLR pod kontrolą odpowiednio promotorów IL-8 i GAPDH.

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (21).

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

Ważna metoda badawcza: badanie, które uznano za wystarczająco istotne i wiarygodne dla danego celu i które opiera się na uzasadnionych naukowo podstawach. Badanie nie może zostać uznane za ważne w sensie absolutnym, ale tylko w odniesieniu do określonego celu.

▼**M8**

Dodatek 3.2

ZASADA POMIARU AKTYWNOŚCI LUCYFERAZY I OKREŚLANIA WSPÓŁCZYNNIKÓW TRANSMISJI FILTRA OPTYCZNEGO W ODNIESIENIU DO SLO I SLR

Układ do testowania przy użyciu wielu reporterów – Tripluc – można stosować z luminometrem mikropłytkowym posiadającym system detekcji wielu barw, który można wyposażyć w filtr optyczny (np. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Filtrem optycznym stosowanym w pomiarach jest filtr długo- lub krótkoprzepustowy przepuszczający częstotliwości 600–620 nm lub filtr środkowoprzepustowy przepuszczający częstotliwości 600–700 nm.

Pomiar lucyferaz emitujących dwie barwy za pomocą filtra optycznego

W niniejszym przykładzie zastosowano filtr Phelios AB-2350 (ATTO). Przedmiotowy luminometr wyposażony jest w filtr długoprzepustowy przepuszczający częstotliwość 600 nm (R60 HOYA Co., zwany dalej „filtrem długoprzepustowym 600 nm", filtr 1), do rozdzielania luminescencji SLO (λmaks. = 580 nm) i SLR (λmaks. = 630 nm).

Aby wyznaczyć współczynniki transmisji filtra długoprzepustowego 600 nm, najpierw – korzystając z oczyszczonych enzymów lucyferazy SLO i SLR – należy: (i) zmierzyć intensywność bioluminescencji SLO i SLR bez filtra (F0), (ii) zmierzyć intensywność bioluminescencji SLO i SLR, które przeszły przez filtr długoprzepustowy 600 nm (filtr 1), oraz (iii) obliczyć współczynniki transmisji filtra długoprzepustowego 600 nm w odniesieniu do SLO i SLR wymienionych poniżej.

Współczynniki transmisji		Skrót	Definicja
SLO	Współczynniki transmisji filtra 1	$=\kappa O_{R60}$	Współczynnik transmisji filtra dla SLO
SLR	Współczynniki transmisji filtra 1	κR_{R60}	Współczynnik transmisji filtra dla SLR

Jeżeli intensywność SLO i SLR w badanej próbce określono odpowiednio jako O i R, (i) intensywność światła bez filtra (tylko optycznego) F0 i (ii) intensywność światła przechodzącego przez filtr długoprzepustowy 600 nm (filtr 1) F1 opisuje się w sposób określony poniżej:

$F0 = O + R$

$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Wzory te można wyrazić następująco:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Wówczas za pomocą obliczonych czynników przepuszczalności (κO_{R60} i κR_{R60}) oraz zmierzonych wartości dla F0 i F1 można obliczyć wartości O i R w następujący sposób:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼**M8**

Materiały i metody wyznaczania czynnika przepuszczalności

1) *Odczynniki*

Pojedyncze oczyszczone enzymy lucyferazy:

liofilizowany oczyszczony enzym SLO

liofilizowany oczyszczony enzym SLR

(które dla celów walidacji pozyskano z GPC Lab. Co. Ltd. w Tottori w Japonii razem z linią komórkową THP-G8).

Odczynnik testowy:

odczynnik testowy lucyferazy Tripluc® (np. z TOYOBO Cat#MRA-301).

Podłoże: do testu lucyferazy (30 ml, przechowywane w temperaturze 2–8 °C).

Odczynnik	Stężenie	Stężenie końcowe w podłożu	Wymagana ilość
RPMI-1640	—	—	27 ml
Bydlęca surowica płodowa	—	10 %	3 ml

2) *Przygotowanie roztworu enzymu*

Liofilizowany oczyszczony enzym lucyferazy należy rozpuścić w probówce, dodając 200 µl Tris/HCl lub HEPES/HCl o stężeniu 10–100 mM (pH 7,5–8,0) zawierającego 10 % (w/v) glicerolu, podzielić roztwór enzymu na podwielokrotności 10 µl w jednorazowych probówkach o pojemności 1,5 ml i przechowywać je w zamrażarce w temperaturze -80 ^{o}C. Zamrożony roztwór enzymu nadaje się do użycia przez okres do 6 miesięcy. Podczas korzystania z roztworu należy dodać 1 ml podłoża do testu lucyferazy (RPMI-1640 zawierającego 10 % bydlęcej surowicy płodowej) do każdej probówki zawierającej roztwory enzymu (rozcieńczony roztwór enzymu), a probówki należy przechowywać na lodzie, by zapobiec dezaktywacji enzymów.

3) *Pomiar bioluminescencji*

Rozmrozić odczynnik do testu lucyferazy Tripluc® (Tripluc) i przechowywać w temperaturze pokojowej w łaźni wodnej albo w temperaturze otoczenia. Luminometr należy włączyć 30 minut przed rozpoczęciem pomiaru, aby umożliwić stabilizację fotopowielacza. 100 µl rozcieńczonego roztworu enzymu należy przenieść do dołków 96-dołkowej czarnej płytki (płaskodennej) (próbka referencyjna SLO do #B1, #B2, #B3, próbka referencyjna SLR do #D1, #D2, #D3). Następnie za pomocą pipety należy przenieść 100 µl podgrzanego odczynnika Tripluc do każdego dołka płytki zawierającego rozcieńczony roztwór enzymu. Płytkę należy wytrząsać przez 10 minut w temperaturze pokojowej (około 25 ^{o}C) w wytrząsarce do płytek. Jeżeli w dołkach pojawią się pęcherzyki powietrza, należy je usunąć. Płytkę należy umieścić w luminometrze, aby dokonać pomiaru aktywności lucyferazy. Bioluminescencję mierzy się każdorazowo przez 3 sekundy zarówno z zastosowaniem filtra optycznego (F1), jak i bez niego (F0).

Współczynnik transmisji filtra optycznego obliczono w następujący sposób:

współczynnik transmisji (SLO (κO_{R60})) = (#B1 z F1 + #B2 z F1 + #B3 z F1) / (#B1 z F0 + #B2 z F0 + #B3 z F0)

▼**M8**

Współczynnik transmisji (SLR (κR_{R60}))= (#D1 z F1 + #D2 z F1 + #D3 z F1) / (#D1 z F0 + #D2 z F0+ #D3 z F0)

Obliczone współczynniki przepuszczalności wykorzystuje się do wszystkich pomiarów wykonywanych przy pomocy tego samego luminometru.

Kontrola jakości sprzętu

Należy stosować procedury opisane w protokole IL-8 Luc (18).

▼M8

Dodatek 3.3

SUBSTANCJE SŁUŻĄCE DO WYKAZANIA BIEGŁOŚCI

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania opisanego w niniejszym dodatku do metody badawczej B.71 laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo określając prognozę testu IL-8 Luc dla 9 substancji wskazanych w tabeli 1 oraz określając wartości, które mieszczą się w odpowiednim zakresie odniesienia, dla co najmniej 8 z 9 substancji służących do wykazania biegłości (wybranych w celu przedstawienia zakresu reakcji na zagrożenia związane z działaniem uczulającym na skórę). Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz dostępnością wysokiej jakości danych *in vitro* uzyskanych w wyniku zastosowania testu IL-8 Luc. W odniesieniu do testu IL-8 Luc można znaleźć również opublikowane dane referencyjne (6)(1).

Tabela 1

Substancje zalecane do wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do testu IL-8 Luc

Substancje służące do wykazania biegłości	Nr CAS	Stan skupienia	Rozpuszczalność w X-VIVO15 przy stężeniu 20 mg/ml	Prognoza *in vivo* (1)	Prognoza dotycząca IL-8 Luc (2)	Zakres odniesienia (µg/ml) (3)	
						CV05 (4)	Minimalny próg indukcji IL-8 Luc (5)
2,4-dinitrochlorobenzen	97-00-7	Stały	Nierozpuszczalny	Czynnik uczulający (wyjątkowo silny)	Dodatni	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehyd	50-00-0	Ciekły	Rozpuszczalny	Czynnik uczulający (silny)	Dodatni	9–30	4–9
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Stały	Nierozpuszczalny	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	Dodatni	250–290	60–250
Etyleneodiamina	107-15-3	Ciekły	Rozpuszczalny	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	Dodatni	500–700	0,1–0,4
Dimetakrylan glikolu etylenowego	97-90-5	Ciekły	Nierozpuszczalny	Czynnik uczulający (słaby)	Dodatni	>2 000	0,04–0,1
4-allilamizol (Estragol)	140-67-0	Ciekły	Nierozpuszczalny	Czynnik uczulający (słaby)	Dodatni	>2 000	0,01–0,07
Siarczan streptomycyny	3810-74-0	Stały	Rozpuszczalny	Brak działania uczulającego	Ujemny	>2 000	>2 000
Glicerol	56-81-5	Ciekły	Rozpuszczalny	Brak działania uczulającego	Ujemny	>2 000	>2 000
Izopropanol	67-63-0	Ciekły	Rozpuszczalny	Brak działania uczulającego	Ujemny	>2 000	>2 000

Skróty: Nr CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service.

(1) Siłę działania *in vivo* określa się na podstawie kryteriów zaproponowanych przez ECETOC (19).

(2) Na podstawie historycznych wartości zaobserwowanych (1)(6).

(3) Wartość CV_{05} i minimalny próg indukcji IL-8 Luc obliczono, wykorzystując wartość rozpuszczalności w wodzie określoną przy użyciu EPI Suite™.

(4) CV_{05}: minimalne stężenie, przy którym substancje chemiczne wykazują wartość Inh-GAPLA poniżej 0,05.

(5) Minimalny próg indukcji: najniższe stężenia, przy którym substancja chemiczna spełnia kryteria uzyskania wyniku dodatniego.

▼M8

Dodatek 3.4

WSKAŹNIKI I KRYTERIA OCENY

nIL8LA (nSLO-LA)

Dokonuje się pomiaru określonego kolejnego powtórzenia *j* (j = 1–4) określonego kolejnego stężenia *i* (i = 0–11) odpowiednio dla IL8LA (SLO-LA) oraz GAPLA (SLR-LA). Znormalizowaną IL8LA, zwaną nIL8LA (nSLO-LA), określa się następująco:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Jest to podstawowa jednostka miary w niniejszym teście.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Podstawową miarę w niniejszym teście stanowi wzrost krotności uśrednionego nIL8LA (nSLO-LA) dla powtórzenia określonego kolejnego stężenia *i* w porównaniu z uśrednionym nIL8LA (nSLO-LA) przy stężeniu wynoszącym 0, Ind-IL8LA. Stosunek ten wyraża się za pomocą następującego wzoru:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

Laboratorium wiodące zaproponowało, aby wartość 1,4 odpowiadała dodatniemu wynikowi badanej substancji chemicznej. Wartość tę określono przez zbadanie danych historycznych z laboratorium wiodącego. Następnie zespół ds. zarządzania danymi wykorzystywał tę wartość na wszystkich etapach badania walidacyjnego. Początkowy wynik, Ind-IL8LA, jest stosunkiem 2 średnich arytmetycznych, jak pokazano w równaniu.

95-procentowy przedział ufności (95 % CI)

Na podstawie tego wskaźnika można oszacować 95-procentowy przedział ufności (95 % CI), aby pokazać pokazuje precyzję tego pomiaru początkowego wyniku. Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności wynosząca ≥1 wskazuje na to, że wartość nIL8LA przy określonym kolejnym stężeniu *i* jest znacznie większa niż w kontroli z rozpuszczalnikiem. Istnieje kilka sposobów opracowania 95-procentowego przedziału ufności. W niniejszym badaniu wykorzystano metodę znaną jako twierdzenie Fiellera. 95-procentowy przedział ufności uzyskuje się, korzystając z następującego wzoru:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

gdzie:

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \textstyle\sum_j \mathrm{nIL8LA_{0j}}$$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2$

$t_{0.975(\nu)}$ wynosi 97,5 percentyla centralnego rozkładu t przy stopniu swobody ν, gdzie

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) \Big/ \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA jest stosunkiem uśrednionego GAPLA (SLR-LA) dla powtórzenia określonego kolejnego stężenia *i* do stężenia w kontroli z rozpuszczalnikiem, a wartość tę wyraża się jako:

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} \Big/ \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}$$

.

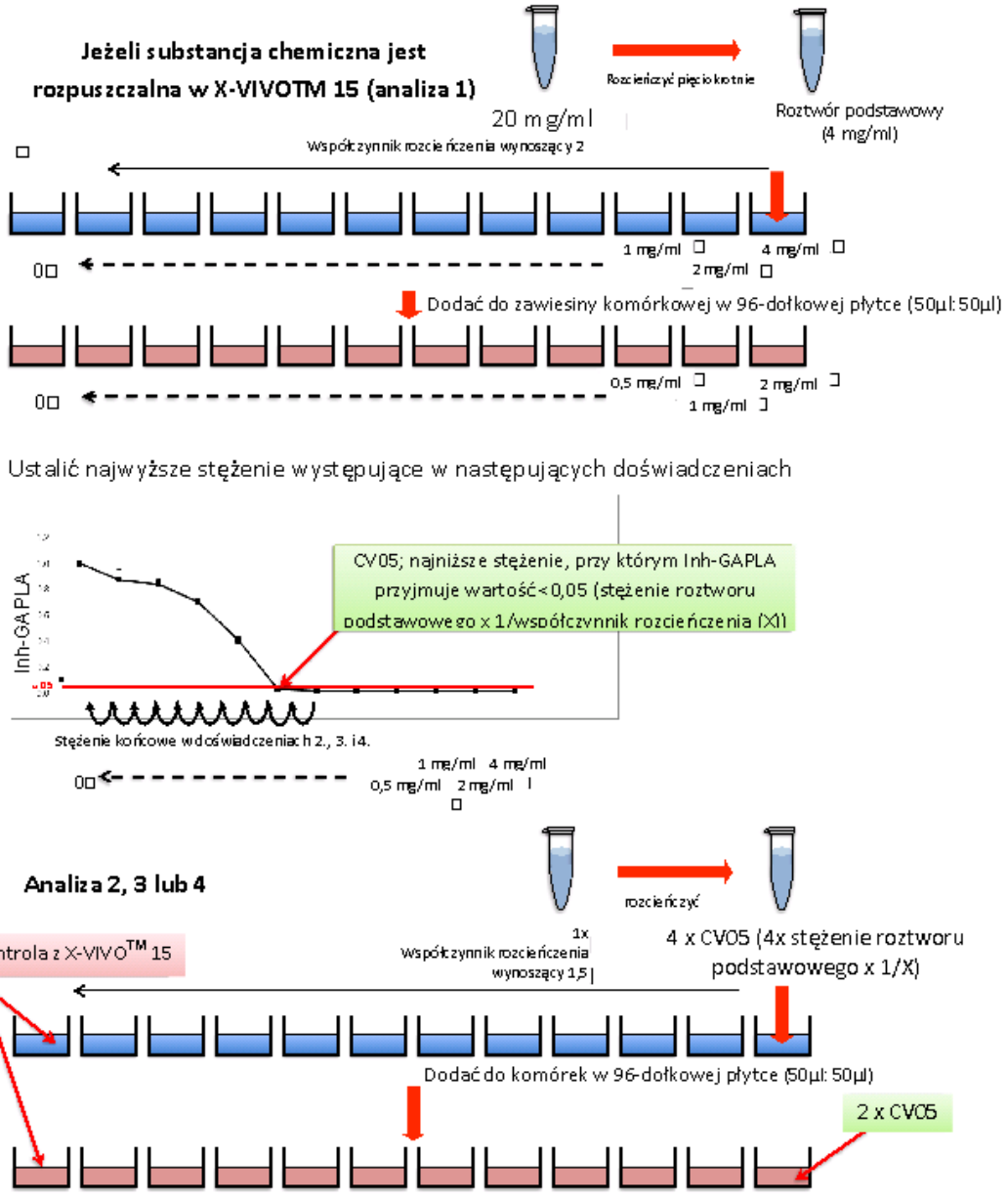
Ponieważ GAPLA jest mianownikiem nIL8LA, bardzo mała wartość powoduje duże zróżnicowanie nIL8LA. Dlatego też wartości Ind-IL8LA przy bardzo małej wartości Inh-GAPLA (poniżej 0,05) można uznać za mało precyzyjne.

▼**M8**

Dodatek 3.5

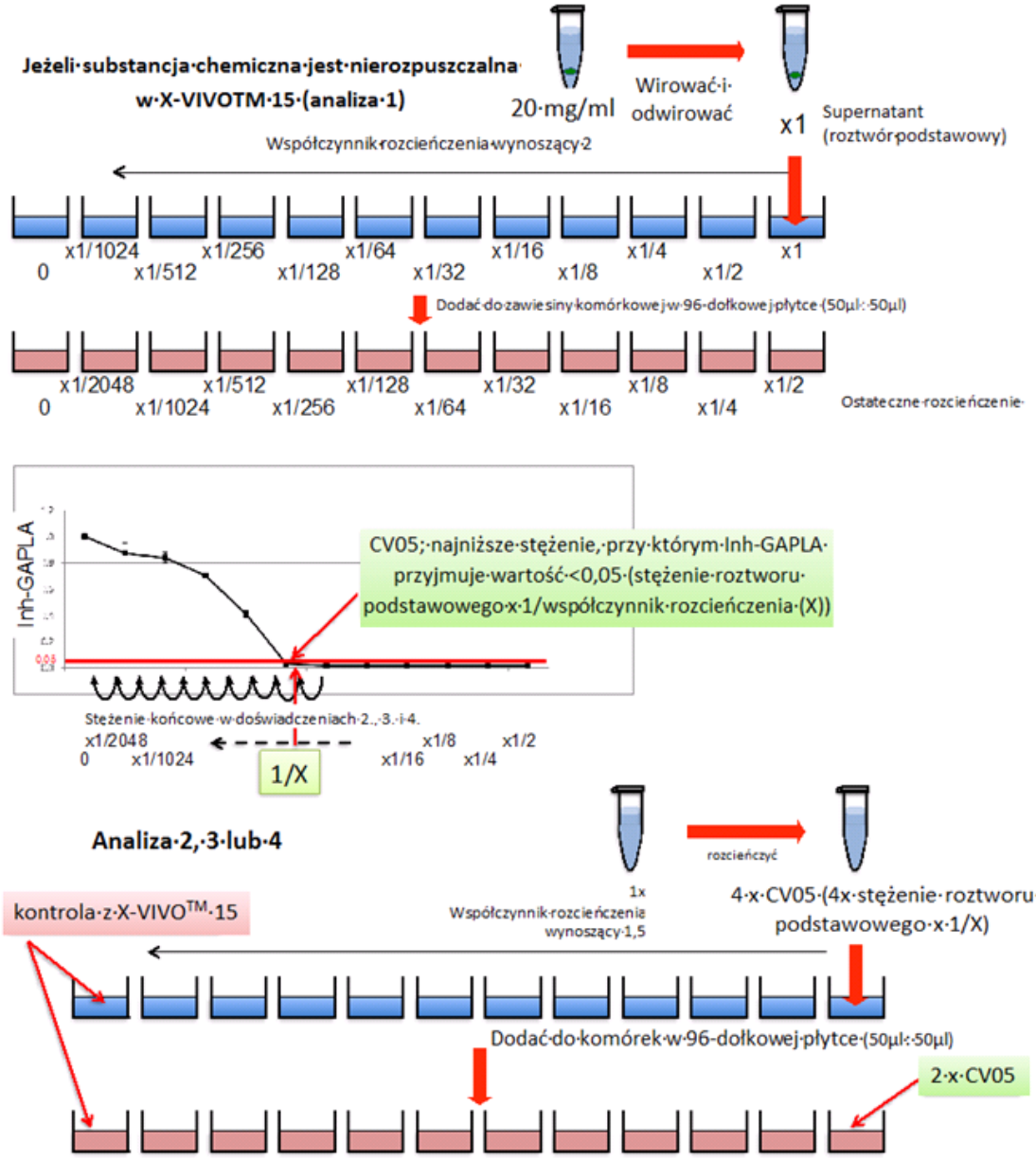
SCHEMAT METOD ROZPUSZCZANIA SUBSTANCJI CHEMICZNYCH W TEŚCIE IL-8 LUC

a) W przypadku substancji chemicznych rozpuszczanych w X-VIVO™ 15 w stężeniu 20 mg/ml



▼**M8**

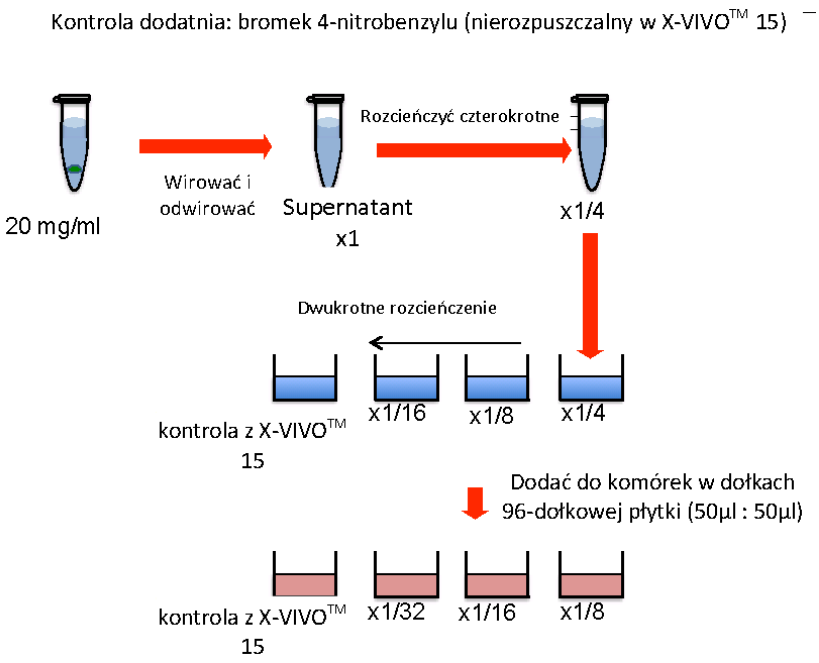
b) W przypadku substancji chemicznych nierozpuszczalnych w X-VIVO™ 15 w stężeniu 20 mg/ml



▼**M8**

Dodatek 3.6

SCHEMAT METOD ROZPUSZCZANIA BROMKU 4-NITROBENZYLU NA POTRZEBY KONTROLI DODATNIEJ W TEŚCIE IL-8 LUC;



▼B

CZĘŚĆ C: METODY USTALANIA EKOTOKSYCZNOŚCI

SPIS TREŚCI

C.1. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA DLA RYB

C.2. BADANIE NAGŁEGO UNIERUCHOMIENIA *DAPHNIA* SP.

C.3. BADANIE ZAHAMOWANIA WZROSTU SŁODKOWODNYCH GLONÓW I CYJANOBAKTERII

C.4. OZNACZENIE BIODEGRADOWALNOŚCI

CZĘŚĆ I. ROZWAŻANIA OGÓLNE

CZĘŚĆ II. BADANIE DOC METODĄ „DIE-AWAY" (Metoda C.4-A)

CZĘŚĆ III. ZMODYFIKOWANE BADANIE PRZESIEWOWE OECD (Metoda C.4-B)

CZĘŚĆ IV. BADANIE WYDZIELANIA CO_2 (Metoda C.4-C)

CZĘŚĆ V. BADANIE RESPIROMETRII MANOMETRYCZNEJ (Metoda C.4.D)

CZĘŚĆ VI. BADANIE „ZAMKNIĘTEJ BUTLI" (Metoda C.4-E)

CZĘŚĆ VII. BADANIE M.I.T.I. (Metoda C.4-F)

C.5. DEGRADACJA – ZAPOTRZEBOWANIE BIOCHEMICZNE NA TLEN

C.6. DEGRADACJA – ZAPOTRZEBOWANIE CHEMICZNE NA TLEN

C.7. ROZKŁAD – ROZKŁAD ABIOTYCZNY: HYDROLIZA JAKO FUNKCJA PH

C.8. TOKSYCZNOŚĆ DŻDŻOWNIC

C.9. BIODEGRADACJA – BADANIE ZAHN-WELLENS

C.10. SYMULACYJNE BADANIE W WARUNKACH TLENOWYCH W OCZYSZCZALNIACH ŚCIEKÓW: C.10-A: ZESTAWY OSADU CZYNNEGO - C.10-B: BIOFILMY

C.11. BADANIE HAMOWANIA ODDYCHANIA OSADÓW CZYNNYCH (UTLENIANIE WĘGLA I AMONU)

C12. BIODEGRADACJA – ZMODYFIKOWANE BADANIE SCAS

C.13. BIOAKUMULACJA U RYB: NARAŻENIE DROGĄ WODNĄ I POKARMOWĄ

C14. BADANIE ROZWOJU MŁODYCH RYB

C.15. RYBY, KRÓTKOTERMINOWE BADANIE TOKSYCZNOŚCI NA EMBRIONIE I NARYBKU

C.16. PSZCZOŁY MIODNE – BADANIE TOKSYCZNOŚCI OSTREJ DROGĄ POKARMOWĄ

C.17. PSZCZOŁY MIODNE – BADANIE KONTAKTOWEJ TOKSYCZNOŚCI OSTREJ

C.18. ADSORPCJA/DESORPCJA PRZY UŻYCIU METODY RÓWNOWAGI OKRESOWEJ

▼B

C.19.	OSZACOWANIE WSPÓŁCZYNNIKA ADSORPCJI (K_{oc}) NA GLEBIE IW OSADZIE ŚCIEKOWYM PRZY ZASTOSOWANIU WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC)
C.20.	BADANIE WPŁYWU SUBSTANCJI NA ROZRODCZOŚĆ *DAPHNIA MAGNA*
C.21.	MIKROORGANIZMY GLEBOWE: BADANIA PRZEMIAN AZOTU
C.22.	MIKROORGANIZMY GLEBOWE: BADANIE PRZEMIAN WĘGLA
C.23.	PRZEMIANY W GLEBIE W WARUNKACH NATLENIENIA I BEZTLENOWYCH
C.24.	PRZEMIANY TLENOWE I BEZTLENOWE W UKŁADACH OSADÓW WODNYCH
C.25.	MINERALIZACJA TLENOWA W WODZIE POWIERZCHNIOWEJ — SYMULACYJNE BADANIE BIODEGRADACJI
C.26.	BADANIE ZAHAMOWANIA WZROSTU U GATUNKÓW LEMNA
C.27.	BADANIE TOKSYCZNOŚCI W UKŁADZIE OSAD-WODA NA OCHOTKOWATYCH Z WYKORZYSTANIEM WZBOGACONEGO OSADU
C.28.	BADANIE TOKSYCZNOŚCI W UKŁADZIE OSAD-WODA NA OCHOTKOWATYCH Z WYKORZYSTANIEM WZBOGACONEJ WODY
C.29.	SZYBKA BIODEGRADOWALNOŚĆ – $CO_{2\ W}$ SZCZELNIE ZAMKNIĘTYCH NACZYNIACH (Badanie fazy gazowej nad roztworem)
C.30.	BIOACCUMULATION IN TERRESTRIAL OLIGOCHAETES
C.31.	BADANIE ROŚLIN LĄDOWYCH: BADANIE WSCHODÓW I WZROSTU SIEWEK
C.32.	BADANIE ROZRODCZOŚCI WAZONKOWCOWATYCH
C.33.	BADANIE ROZRODCZOŚCI DŻDŻOWNIC (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)
C.34.	OKREŚLENIE ZAHAMOWANIA AKTYWNOŚCI BAKTERII BEZTLENOWYCH – OGRANICZENIE WYTWARZANIA GAZU Z BEZTLENOWO FERMENTUJĄCYCH OSADÓW (ŚCIEKOWYCH)
C.35.	BADANIE TOKSYCZNOŚCI W UKŁADZIE OSAD DENNY-WODA NA *LUMBRICULUS* Z WYKORZYSTANIEM WZBOGACONEGO OSADU
C.36.	BADANIE ROZRODCZOŚCI DRAPIEŻNYCH ROZTOCZY (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) W GLEBIE
C.37.	21-DNIOWE BADANIE RYB: KRÓTKOTERMINOWE BADANIE PRZESIEWOWE AKTYWNOŚCI ESTROGENNEJ I ANDROGENNEJ ORAZ ZAHAMOWANIE AROMATAZY
C.38.	BADANIE PRZEOBRAŻENIA PŁAZÓW
C.39.	BADANIE ROZRODCZOŚCI SKOCZOGONKÓW (*COLLEMBOLA*) W GLEBIE

▼B

C.40.	BADANIE TOKSYCZNOŚCI W UKŁADZIE OSAD-WODA W CYKLU ŻYCIA OCHOTKOWATYCH Z WYKORZYSTANIEM WZBOGACONEJ WODY LUB WZBOGACONEGO OSADU
C.41.	BADANIE ROZWOJU PŁCIOWEGO RYB
C.42.	BIODEGRADOWALNOŚĆ W WODZIE MORSKIEJ
C.43.	BIODEGRADOWALNOŚĆ BEZTLENOWA SUBSTANCJI ORGANICZNYCH W PRZEFERMENTOWANYM OSADZIE: ZA POMOCĄ POMIARU WYTWARZANEGO GAZU
C.44.	WYMYWANIE W KOLUMNACH GLEBOWYCH
C.45.	OSZACOWANIE EMISJI DO ŚRODOWISKA Z DREWNA PODDANEGO DZIAŁANIU ŚRODKÓW KONSERWUJĄCYCH: METODA LABORATORYJNA STOSOWANA W ODNIESIENIU DO PRODUKTÓW Z DREWNA. KTÓRE NIE SĄ POKRYTE I MAJĄ STYCZNOŚĆ Z WODĄ SŁODKĄ LUB WODĄ MORSKĄ
C.46.	BIOAKUMULACJA U BENTOSOWYCH SKĄPOSZCZETÓW ŻYJĄCYCH W OSADZIE
C.47.	BADANIE TOKSYCZNEGO WPŁYWU SUBSTANCJI NA RYBY WE WCZESNYCH STADIACH ROZWOJU
C.48.	KRÓTKOTERMINOWE BADANIE ROZRODCZOŚCI RYB
C.49.	BADANIE TOKSYCZNOŚCI OSTREJ NA RYBICH EMBRIONACH (FET)
C.50.	BADANIE TOKSYCZNOŚCI NA *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* W UKŁADZIE POZBAWIONYM OSADU
C.51.	BADANIE TOKSYCZNOŚCI NA *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* W UKŁADZIE WODA-OSAD
C.52.	ROZSZERZONE BADANIE ROZRODCZOŚCI JEDNEGO POKOLENIA RYŻANKI JAPOŃSKIEJ (MEOGRT)
C.53.	TEST WZROSTU I ROZWOJU PŁAZÓW W STADIUM LARWALNYM (LAGDA)

▼B

C.1. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA DLA RYB

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Celem niniejszego badania jest ustalenie ostrej toksyczności śmiertelnej substancji dla ryb w wodach słodkich. Pożądane jest posiadanie, w możliwym zakresie, informacji na temat rozpuszczalności w wodzie, ciśnienia pary, stabilności chemicznej, stałych dysocjacji i rozkładu biologicznego substancji badanej, co pomoże w wybraniu najwłaściwszej metody badania (statycznej, półstatycznej lub przepływowej), tak aby zapewnić zadowalające, stałe stężenia substancji badanej w czasie wykonywania badania.

Przy planowaniu i interpretacji wyników badania należy także wziąć pod uwagę dodatkowe informacje (np. wzór strukturalny, stopień czystości, charakter i zawartość procentowa istotnych zanieczyszczeń, obecność i ilość substancji pomocniczych oraz współczynnik podziału n-oktanol/woda).

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Toksyczność ostra to rozpoznawalne działanie niepożądane na organizm w ciągu krótkiego okresu ekspozycji (rzędu dni) na substancję. W niniejszym badaniu toksyczność ostrą wyraża się jako medianę stężenia śmiertelnego (LC), tj. stężenie w wodzie, które powoduje śmierć 50 % badanego stada ryb podczas okresu stałej ekspozycji, który musi zostać podany.

Wszystkie stężenia substancji badanej podano jako waga na objętość (miligramy na litr). Mogą być również wyrażone jako stosunek wagi do wagi (mg/kg^{-1}).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Substancję odniesienia można zbadać w celu zademonstrowania, że w warunkach laboratoryjnego badania, reakcja badanych gatunków nie zmieniła się znacząco.

Dla niniejszego badania nie wyszczególniono żadnych substancji odniesienia.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Badanie graniczne można przeprowadzić przy 100 mg na litr w celu zademonstrowania że LC_{50} jest większy niż to stężenie.

Ryby są poddawane ekspozycji na substancje badaną dodaną do wody w danym zakresie stężeń na okres 96 godzin. Odnotowuje się liczby zgonów w odstępach co najmniej 24-godzinnych i oblicza się stężenia uśmiercające 50 % ryb (LC_{50}) w każdym momencie obserwacji, o ile to możliwe.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Kryteria jakościowe należy odnieść do badania granicznego, jak również do pełnej metody badania.

Śmiertelność w grupach kontrolnych nie może przekraczać 10 % (lub jednej ryby, o ile stosuje się mniej niż 10) na koniec badania.

Stężenie rozpuszczonego tlenu musi być wyższa niż 60 % wartości nasycenia powietrzem przez cały czas.

▼B

Stężenia substancji badanej powinny być utrzymywane do 80 % wstępnych stężeń poprzez czas trwania badania.

Dla substancji łatwo rozpuszczalnych w podłożu badanym roztwory podatne na stabilność, to jest te które nie wykazują żadnego znacznego stopnia ulatniania, rozkładu, hydrolizy lub absorpcji, początkowe stężenie uważane jest za równoważne nominalnemu stężeniu. Należy przedstawić dowody, że utrzymano stężenia poprzez całe badanie i spełniono kryteria jakościowe.

Dla substancji, które są:

(i) słabo rozpuszczalne w podłożu badawczym; lub

(ii) zdolne do tworzenia stabilnych emulsji lub zawiesin; lub

(iii) niestabilne w roztworach wodnych,

początkowe stężenie musi być pobrane jako zmierzone stężenie w roztworze (lub, jeśli to technicznie niemożliwe, zmieszone w słupie wody) na początku badania. Stężenie należy oznaczyć po okresie równowagi, lecz przed wprowadzeniem badanych ryb.

W każdym z tych przypadków, muszą być prowadzone dalsze pomiary w czasie trwania badania dla potwierdzenia rzeczywistych stężeń ekspozycji lub spełnienia kryteriów jakościowych.

pH nie może się zmieniać więcej niż o jedną jednostkę.

1.6. OPIS METODY BADANIA

Można zastosować trzy rodzaje procedury:

Badanie statyczne:

Badanie toksyczności, w którym nie zachodzi przepływ badanego roztworu. (Roztwory pozostają bez zmian w trakcie całego badania).

Badanie półstatyczne:

Badanie bez przepływu roztworu, jednak z regularnymi odnowieniami roztworów badanych z tej samej serii po wydłużonych odstępach czasu (np. co 24 godziny).

Badanie przepływowe:

Badanie toksyczności, w którym wodę stale się odnawia w komorach badawczych, przy czym badany związek chemiczny jest transportowany z wodą wykorzystywaną do odnowy podłoża badawczego.

1.6.1. **Odczynniki**

1.6.1.1. *Roztwory substancji badanych*

Przygotowuje się roztwory podstawowe o wymaganej mocy przez rozpuszczenie substancji w wodzie dejonizowanej lub w wodzie przygotowanej według opisu w ppkt 1.6.1.2.

Wybrane stężenia badane przygotowuje się przez rozcieńczanie roztworu podstawowego. W przypadku badania wysokich stężeń substancję można rozpuścić bezpośrednio w wodzie do rozcieńczania.

▼B

Substancje zwykle należy badać tylko do granicy rozpuszczalności. Dla niektórych substancji (na przykład dla substancji posiadających niską rozpuszczalność w wodzie lub o wyższym P_{ow} lub tych tworzących raczej stabilne zawiesiny niż roztwory rzeczywiste w wodzie) jest dopuszczalne stężenie badania powyżej granicy rozpuszczalności celem zapewnienia, że uzyskano maksymalne stężenie rozpuszczenia/stabilności. Jest ważne jednakże, żeby to stężenie w żaden sposób nie zakłócało systemu badania (np. warstwa substancji na powierzchni wody zapobiegająca utlenianiu wody itp.).

Stosuje się ultradźwiękowe rozpraszanie, rozpuszczalniki organiczne, emulsyfikatory lub dyspergatory jako środki do przygotowania roztworów podstawowych substancji o niskiej rozpuszczalności lub w celu ułatwienia rozproszenia tych substancji w podłożu badawczym. Jeżeli stosuje się takie substancje pomocnicze, wszystkie badane stężenia muszą zawierać tę samą ilość substancji pomocniczej oraz dodatkowa grupa kontrolna ryb powinna być poddana ekspozycji przy tym samym stężeniu substancji pomocniczej, które użyto w badanych seriach. Stężenie takich substancji należy zminimalizować, lecz w żadnym przypadku nie może przekraczać 100 mg na litr w podłożu badawczym.

Badanie należy przeprowadzić bez regulacji pH. Jeżeli istnieją oznaki zaznaczonej zmiany pH, doradza się powtórzenie badania z odpowiednim dostosowaniem jego wartości i przedstawienie uzyskanych wtedy wyników. W takim przypadku wartość pH roztworu podstawowego należy doprowadzić do pH wody do rozcieńczenia, chyba że istnieją powody, dla których nie należy tego robić. HCl i NaOH są zalecane w tym celu. Regulację pH należy przeprowadzić w taki sposób, aby nie zmienić w istotnym stopniu stężenia substancji badanej w roztworze podstawowym. W przypadku gdyby zaszła reakcja chemiczna lub doszło do fizycznego wytrącania się osadu badanego związku z powodu ustawiania pH, należy podać ten fakt.

1.6.1.2. *Woda hodowlana i woda do rozcieńczania*

Można zastosować wodę do picia z sieci wodociągowej (niezanieczyszczoną przez chlor, metale ciężkie lub inne substancje w niebezpiecznym stężeniu), dobrej jakości wodę zwykłą lub wodę odtworzoną (zob. woda o całkowitej twardości pomiędzy 10 i 250 mg na litr (jako $CaC0_3$) i o pH 6,0–8,5 jest zalecana.

1.6.2. **Przyrząd**

Wszystkie elementy przyrządu muszą być wykonane z materiału obojętnego chemicznie:

— automatyczny układ rozcieńczający (do badania przepływowego),

— miernik tlenu,

— wyposażenia do oznaczania twardości wody,

— odpowiednie urządzenia do regulacji temperatury,

— miernik pH.

1.6.3. **Badane ryby**

Ryby powinny być zdrowe i wolne od jakichkolwiek widocznych wad rozwojowych.

▼B

Stosowane gatunki należy wybrać na podstawie kryteriów praktycznych, takich jak stała dostępność w ciągu roku, łatwość utrzymania, dogodność badania, względna wrażliwość na substancje chemiczne i wszystkie czynniki ekonomiczne, bilogiczne lub środowiskowe mające posiadające jakiekolwiek znaczenie. Przy doborze gatunków ryb musi zrodzić się również przemyślenie potrzeby porównywalności uzyskanych danych do istniejących uznanych danych międzynarodowych (pozycja 1).

Wykaz zalecanych gatunków ryb do przeprowadzenia niniejszego badania podano w dodatku 2; najlepszymi gatunkami są pstrąg tęczowy i danio pręgowany.

1.6.3.1. *Hodowla*

Najkorzystniej, aby stosowane w badaniu ryby pochodziły z pojedynczego stada o podobnej długości i wieku. Należy je hodować przez co najmniej 12 dni w następujących warunkach:

napełnienie:

właściwe dla systemu (recyrkulacyjnego lub przepływowego) i gatunku ryb,

woda:

zob. 1.6.1.2,

światło:

12–16 godzin naświetlenia dziennie,

stężenie rozpuszczonego tlenu:

co najmniej 80 % wartości nasycenia powietrzem,

karmienie:

trzy razy tygodniowo lub codziennie przerwać 24 godzin przed rozpoczęciem badania.

1.6.3.2. *Śmiertelność*

Po 48-godzinnym okresie przyzwyczajania odnotowuje się śmiertelność i stosuje następujące kryteria:

— większa niż 10 % populacji w ciągu siedmiu dni:

odrzucić całe stado,

— pomiędzy 5 i 10 % populacji:

okres hodowli kontynuuje się przez następnych siedem dni.

Jeżeli nie stwierdzi się dodatkowych zgonów, stado można zaakceptować; w przeciwnym razie należy je odrzucić,

— poniżej 5 % populacji:

stado można zaakceptować.

1.6.4. **Adaptacja**

Wszystkie ryby muszą pozostawać w kontakcie z wodą o jakości i temperaturze odpowiadającej wodzie wykorzystywanej w badaniu przez co najmniej siedem dni przed ich zastosowaniem.

▼B

1.6.5. **Procedura badania**

Badanie ostateczne można poprzedzić przeprowadzeniem badania służącego wyznaczeniu zakresu stężeń, aby uzyskać informacje na temat zakresu stężeń, który zostanie wykorzystany w zasadniczym badaniu.

Dodatkowo do badanych serii przeprowadza się również badanie jednej grupy kontrolnej bez badanej substancji i, jeśli stosowne, jednej grupy kontrolnej dla substancji pomocniczej.

Zależnie od właściwości fizycznych i chemicznych badanego związku należy wybrać badanie statyczne, półstatyczne lub przepływowe, tak aby zapewnić spełnienie kryteriów jakościowych.

Ryby poddaje się ekspozycji na substancję w sposób opisany poniżej:

— czas trwania: 96 godzin,

— liczba zwierząt: co najmniej 7 na stężenie,

— zbiorniki: o odpowiedniej pojemności w relacji do zalecanego napełnienia,

— napełnienie: zaleca się maksymalne napełnienie 1 g na litr w przypadku badań statycznych i półstatycznych; w przypadku systemów przepływowych można zaakceptować większe napełnienie,

— stężenie badania: co najmniej pięć stężeń różniących się stałym czynnikiem nieprzekraczającym 2,2 i tak dalece jak to możliwe, rozpiętości zakresu śmiertelności od 0 do 100 %,

— woda: zob. 1.6.1.2,

— oświetlenie: 12 do 16 godzin dziennie,

— temperatura: właściwa dla gatunków (dodatek 2), jednak utrzymana w granicach ± 1 ^{o}C w przypadku każdego z badań,

— stężenie rozpuszczonego tlenu: nie mniej niż 60 % wartości nasycenia powietrzem w wybranej temperaturze,

— karmienie: żadne.

Ryby kontroluje się po upływie pierwszych 2 do 4 godzin, a następnie w odstępach co najmniej 24-godzinnych. Uważa się je za martwe, gdy dotknięcie nasady ogona nie prowadzi do reakcji i nie widać ruchów oddechowych. Martwe ryby usuwa się podczas obserwacji i odnotowuje liczbę zgonów. Dokumentuje się wszelkie widoczne nieprawidłowości (np. utratę równowagi, zmiany zachowania podczas pływania, zmiany czynności oddechowej, pigmentacji itp.).

Należy wykonywać codzienne pomiary pH, rozpuszczonego tlenu i temperatury.

Badanie graniczne

Stosując procedury opisane w niniejszej metodzie badania, przeprowadza się badanie graniczne przy stężeniu 100 mg na litr w celu pokazania że LC_{50} jest większy niż dla danego stężenia.

Jeżeli natura badanej substancji jest taka, że nie można uzyskać stężenia 100 mg na litr w wodzie, badanie graniczne należy przeprowadzić w stężeniu równym rozpuszczalności substancji (lub w maksymalnym stężeniu tworzącym stabilną zawiesinę) w użytym podłożu (zob. także ppkt 1.6.1.1.).

▼B

Badanie graniczne należy przeprowadzić stosując 7–10 ryb, wraz z tą samą liczbą w kontroli(-ach). (Teoria rozkładu dwumianowego pokazuje, że gdy stosuje się 10 ryb o śmiertelności równej zeru, to jest 99,9 % pewności, że LC_{50} jest większy niż stężenie użyte w badaniu granicznym. Dla 7, 8 lub 9 ryb brak śmiertelności daje co najmniej 99 % pewności, że LC_{50} jest większy niż użyte stężenie).

Jeżeli występuje śmiertelność, należy przeprowadzić pełne badanie. Jeżeli obserwowane są działania subletalne, powinny być zapisywane.

2. **DANE I OCENA**

Dla każdego okresu czasu, gdzie zapisywano obserwacje (24, 48, 72 i 96 godzin), należy wykreślić procent śmiertelności dla każdego zalecanego okresu czasu ekspozycji w stosunku do stężenia na papierze logarytm- prawdopodobieństwo.

Jeżeli to możliwe, dla każdego czasu obserwacji, należy oszacować LC_{50} i granice ufności ($p = 0,05$), stosując standartowe procedury; wartości te należy zaokrąglić do jedności, lub najwyżej do dwóch znaczących cyfr (przykłady zaokrąglania: 170 dla 173,5; 0,13 dla 0,127; 1,2 dla 1,21).

W przypadkach gdy kąt nachylenia krzywej zależności stężenia od odpowiedzi procentowej jest zbyt stromy, aby było możliwe obliczenie LC_{50}, wystarczy graficzna ocena szacunkowa tej wartości.

W przypadku gdy kolejne dwa stężenia w stosunku 2,2 dają jedynie umieralność 0 i 100 %, wystarczają one do wskazania zakresu, w którym znajduje się LC_{50}.

W razie zaobserwowania, że nie da się utrzymać stabilności lub jednorodności substancji badanej, należy to zgłosić i wziąć pod uwagę przy interpretacji wyników.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— informacje na temat użytych do badania ryb (nazwa naukowa, szczep, dostawca, wszelkie wcześniejsze kontakty z innymi substancjami, rozmiary i liczba wykorzystana w przypadku każdego badanego stężenia),

— źródło wody do rozcieńczenia i jej najważniejsze parametry chemiczne (pH, twardość, temperatura),

— w przypadku substancji o niskiej rozpuszczalności w wodzie, metoda przygotowania roztworu podstawowego i badanego,

— stężenie wszelkich substancji pomocniczych,

— wykaz zastosowanych stężeń i wszelkie dostępne informacje na temat stabilności w danych stężeniach badanego związku chemicznego w roztworze badanym,

— jeśli przeprowadzono analizy chemiczne, zastosowane metody i uzyskane wyniki,

— wyniki badania granicznego, jeśli przeprowadzono,

— uzasadnienie wyboru i szczegółowe dane na temat zastosowanej procedury badania (np. badanie statyczne, półstatyczne, szybkość dawkowania, szybkość przepływu, czy stosowano napowietrzanie, napełnienie rybami itp.),

▼B

— opis urządzeń,

— reżim oświetlenia,

— stężenia rozpuszczonego tlenu, wartości pH i temperatury roztworów badanych co 24 godziny,

— dowody spełnienia kryteriów jakościowych,

— tabelę pokazującą śmiertelność skumulowaną przy każdym stężeniu i dla roztworów kontrolnych (oraz kontrolnych z substancją pomocniczą, jeśli wymagane) przy każdym z zalecanych czasów obserwacji,

— wykres zależności stężenia od odpowiedzi procentowej pod koniec badania,

— jeżeli możliwe, wartości LC_{50} w każdym z zalecanych czasów obserwacji (o granicach ufności 95 %),

— procedury statystyczne wykorzystywane do ustalania wartości LC_{50},

— uzyskane wyniki jeżeli zastosowano substancje odniesienia,

— najwyższe stężenie badane niepowodujące zgonów w czasie trwania badania,

— najniższe stężenie badane powodujące 100 % zgonów w czasie trwania badania.

4. **LITERATURA**

(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/l,/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 (L1) und L (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 ecotoxicity of 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, Exp. 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

Dodatek 1

Woda po regeneracji

Przykład właściwej wody rozcieńczającej

Wszystkie związki chemiczne muszą być czystości analitycznej.

Woda powinna być wodą destylowaną dobrej jakości, lub wodą dejonizowaną o przewodnictwie elektrycznym poniżej 5 $\mu S/cm^{-1}$.

Przyrząd do destylacji wody nie może zawierać jakichkolwiek części miedzianych.

Roztwory podstawowe

$CaCl_2$. 2H20 (diwodny chlorek wapnia): 11,76 g

Rozpuścić, dopełnić wodą do jednego litra.

$MgSO_4$. 7H20 (heptawodny siarczan magnezu): 4,93 g

Rozpuścić, dopełnić wodą do jednego litra.

$NaHC0_3$ (wodorowęglan sodu): 2,59 g

Rozpuścić, dopełnić wodą do jednego litra.

KCl (chlorek potasu): 0,23 g

Rozpuścić, dopełnić wodą do jednego litra.

Regenerowana woda do rozcieńczania

Zmieszać po 25 ml każdego z czterech roztworów podstawowych i uzupełnić wodą do 1 litra.

Napowietrzać, aż stężenie rozpuszczonego tlenu osiągnie wartość nasycenia powietrzem.

Wartość pH powinna wynosić 7,8 ± 0,2.

W razie potrzeby należy wyregulować pH przy użyciu NaOH (wodorotlenku sodowego) lub HCl (kwasu solnego).

Tak przygotowaną wodę do rozcieńczania odstawia się na około 12 godzin, przy czym nie należy jej dalej napowietrzać.

Suma zawartości jonów Ca i Mg w tym roztworze wynosi 2,5 mmola na litr. Stosunek jonów Ca:Mg wynosi 4:1 i jonów Na:K wynosi 10:1. Całkowita zasadowość niniejszego roztworu jest 8 mmol na litr.

Wszelkie odchylenia w przygotowaniu wody do rozcieńczania nie mogą zmieniać jej składu ani właściwości.

▼B

Dodatek 2

Gatunki ryb zalecane do przeprowadzania badań

Zalecane gatunki	Zalecany zakres temperatur (°C)	Zalecana całkowita długość badanych zwierząt (cm)
Brachydanio rerio(Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio pręgowany	20 do 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas(Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)	20 do 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio(Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Karp zwykły	20 do 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes(Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schiegel 1850) Ryzowka	20 do 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Gupik	20 do 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) Okoń błękitnoskrzeli	20 do 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Pstrąg tęczowy	12 do 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Jaz	20 do 24	6,0 ± 2,0

Zbiór

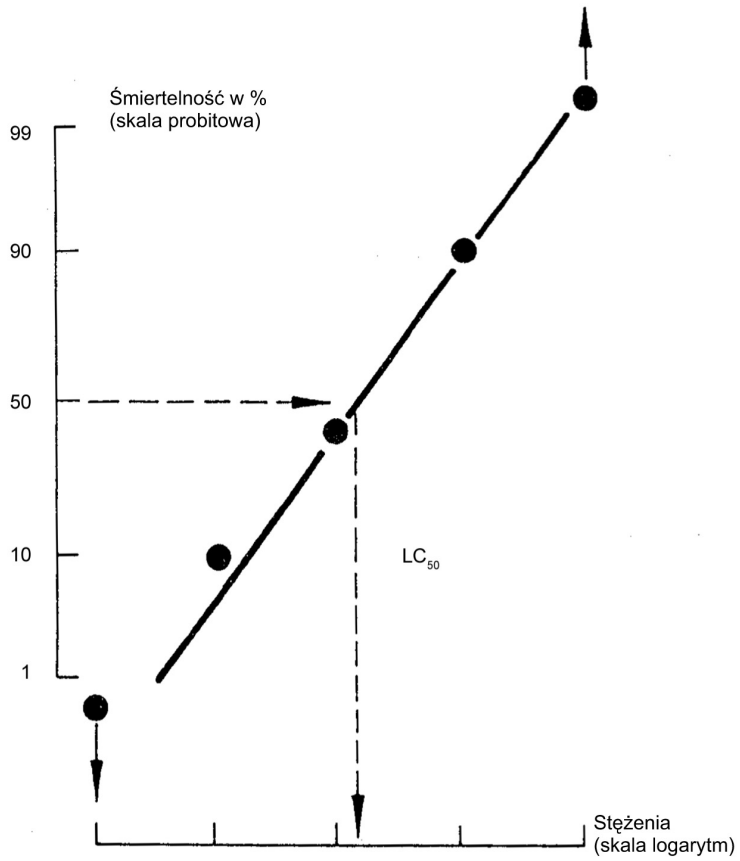
Wymienione poniżej ryby są łatwe w hodowli i szeroko dostępne w ciągu całego roku. Nadają się one do hodowli i rozmnażania albo w gospodarstwach rybnych, albo w laboratoriach, w warunkach chroniących je od chorób i pasożytów. Ryby te dostępne są w wielu miejscach na świecie.

▼B

Dodatek 3

Przykład stężenia: procent śmiertelności

Przykład oznaczenia LC_{50} z użyciem papieru log-probit (logarytm-prawdopodobieństwo)



▼B

C.2. **BADANIE NAGŁEGO UNIERUCHOMIENIA *DAPHNIA* SP.**

1. **METODA**

Opisywana metoda badania nagłego unieruchomienia jest zgodna z OECD TG 202 (2004).

1.1. WSTĘP

Metoda ta jest stosowana w badaniu ostrej toksyczności oceniającym toksyczność w odniesieniu do rozwielitek. Istniejące metody badania były stosowane w możliwym zakresie (1)(2)(3).

1.2. DEFINICJE

W ramach tej metody stosowane są następujące definicje:

EC_{50}: jest stężeniem, które według szacunków powoduje unieruchomienie 50 % rozwielitek w podanym okresie ekspozycji. Jeśli stosowana jest inna definicja, należy to zgłosić, podając jednocześnie odniesienie do niej.

Unieruchomienie: te zwierzęta, które nie są w stanie pływać w ciągu 15 sekund po łagodnym potrząśnięciu naczyniem do badania, są uznawane za unieruchomione (nawet jeśli nadal mogą poruszać czułkami).

1.3. ZASADA METODY BADANIA

Młode rozwielitki w wieku poniżej 24 godzin na początku badania są przez 48 godzin poddawane działaniu badanej substancji o zróżnicowanym stężeniu. Unieruchomienie jest rejestrowane po 24 oraz po 48 godzinach i porównywane z wartościami kontrolnymi. Wyniki są analizowane w celu obliczenia EC_{50} po 48 godz. (definicje zamieszczono w części 1.2). Nie jest konieczna ocena EC_{50} po 24 godz.

1.4. INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI

Rozpuszczalność w wodzie i ciśnienie pary badanej substancji powinny być znane, jak również powinna być dostępna niezawodna metoda określania ilościowego substancji w roztworach testowych o udokumentowanej wydajności i granicy określenia. Pomocnymi informacjami są m.in. wzór strukturalny, czystość substancji, stabilność w wodzie lub pod wpływem światła, P_{ow} i wyniki badania podatności na rozkład biologiczny (zob. metoda C.4).

Uwaga: Instrukcje dotyczące badanych substancji, których właściwości fizykochemiczne utrudniają ich przebadanie, zamieszczono w (4).

1.5. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Można przeprowadzić badanie EC_{50} substancji odniesienia w celu sprawdzenia, czy warunki są właściwe. Zaleca się użycie do tego celu substancji toksycznych stosowanych w międzynarodowych próbach pierścieniowych (1)(5) ([1]). Badania z substancją odniesienia należy przeprowadzać co miesiąc, a co najmniej dwa razy do roku.

([1]) Wyniki tych wewnętrznych badań laboratoryjnych i technicznego sprostowania w sprawie ISO 6341 dają EC_{50} po 24 h dichromianu potasu ($K_2Cr_2O_7$) w przedziale 0,6–1,7 mg/l.

▼B

1.6. KRYTERIA JAKOŚCI

Przy uznawaniu ważności badania stosuje się następujące kryteria:

— w kontrolach, także w kontroli wykorzystującej czynnik rozcieńczający, zostało unieruchomionych nie więcej niż 10 % rozwielitek,

— stężenie rozpuszczonego tlenu w naczyniach kontrolnych i naczyniach do badania powinno wynosić na końcu badania > 3 mg/l.

Uwaga: W przypadku pierwszego kryterium unieruchomienie lub inne oznaki choroby lub stresu, na przykład odbarwienie, nietypowe zachowanie, takie jak utknięcie przy powierzchni, powinno wykazywać nie więcej niż 10 % kontrolnych rozwielitek.

1.7. OPIS METODY BADANIA

1.7.1. **Przyrządy**

Naczynia do badania i inne elementy wyposażenia mające kontakt z roztworami testowymi powinny być w całości wykonane ze szkła lub innych chemicznie obojętnych materiałów. Naczyniami do badania będą zwykle szklane probówki lub zlewki; należy je czyścić przed każdym użyciem, stosując standardowe procedury laboratoryjne. Naczynia do badania powinny być luźno przykryte, aby zmniejszyć utratę wody na skutek parowania i uniknąć dostawania się kurzu do roztworu. Substancje lotne powinny być badane w całkowicie wypełnionych i zamkniętych naczyniach, wystarczająco dużych, aby nie dopuścić do ograniczania ilości lub nadmiernego spadku poziomu tlenu (zob. część 1.6 i 1.8.3 ustęp pierwszy).

Dodatkowo należy używać niektórych lub wszystkich z następujących urządzeń: tlenomierz (z mikroelektrodą lub innym odpowiednim wyposażeniem do mierzenia poziomu tlenu w próbkach o niskiej zawartości tlenu); pehametr; odpowiedni aparat do kontroli temperatury; Sprzęt do określania całkowitego węgla organicznego (TOC); sprzęt do oznaczania chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT), sprzęt do oznaczania twardości itd.

1.7.2. **Badane organizmy**

Zalecanym gatunkiem jest *Daphnia magna* Straus, ale do badania można użyć także innych, nadających się do tego celu gatunków (np. *Daphnia pulex*). Zwierzęta powinny być w wieku niższym niż 24 godziny na początku badania i aby zmniejszyć zróżnicowanie, zaleca się, aby nie było to potomstwo pierwszego pokolenia. Powinny one pochodzić ze zdrowej populacji (tj. nie wykazywać oznak stresu, takich jak wysoka śmiertelność, obecność samców i obecność jaj przetrwalnikowych, opóźnienia w produkcji pierwszego pokolenia, obecność odbarwionych zwierząt itd.). Wszystkie organizmy używane do określonego badania powinny pochodzić z hodowli założonych z tej samej populacji rozwielitek. Hodowane zwierzęta muszą być trzymane w warunkach hodowli (światło, temperatura, pożywka) podobnych do warunków stosowanych później w badaniu. Jeśli pożywka w hodowli rozwielitek w badaniu różni się od pożywki w rutynowych hodowlach, właściwym postępowaniem jest wprowadzenie okresu aklimatyzacji przed badaniem. Z tego powodu pokolenie rodzicielskie rozwielitek powinno być trzymane w wodzie do rozcieńczania w temperaturze do badania przez co najmniej 48 godzin przed rozpoczęciem badania.

▼B

1.7.3. **Woda hodowlana i woda do rozcieńczania**

Woda naturalna (powierzchniowa lub gruntowa), woda regenerowana lub odchlorowana mogą być użyte jako woda do hodowli rozwielitek i woda do rozcieńczania substancji, jeśli rozwielitki przeżyją w niej w czasie hodowli, aklimatyzacji i badania, nie wykazując oznak stresu. Jako wodę do badania można stosować każdy rodzaj wody, której charakterystyka zgodna jest z charakterystyką chemiczną wody nadającej się do rozcieńczania, jak opisano w załączniku 1. W czasie trwania badania jej jakość nie powinna się zmieniać. Woda regenerowana może być przygotowana przed dodanie do wody dejonizowanej lub destylowanej określonych ilości odczynników o czystości odpowiedniej do analizy. Przykłady wody regenerowanej podano w (1) i (6) oraz w załączniku 2. Należy pamiętać, że w przypadku badania substancji zawierającej metale należy unikać pożywek zawierających czynniki chelatujące, takie jak M4 i M7 opisane w załączniku 2. Wartość pH powinna utrzymywać się w przedziale 6–9. Dla *Daphnia magna* zalecana twardość powinna wynosić między 140 a 250 mg/l ($CaCO_3$), dla innych gatunków *Daphnia* może być stosowana woda o mniejszej twardości. Woda do rozcieńczania może być przed użyciem do badania napowietrzona, tak aby tlen rozpuszczony osiągnął stan nasycenia.

Jeśli stosowana jest woda naturalna, jej parametry jakości powinny być sprawdzane co najmniej dwa razy do roku lub zawsze, kiedy istnieje podejrzenie, że mogły one znacznie się zmienić (zob. poprzedni ustęp i załącznik 1). Należy także sprawdzać zawartość metali ciężkich (np. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Jeśli używana jest woda odchlorowana, pożądane jest przeprowadzanie codziennej analizy zawartości chloru. Jeśli woda do rozcieńczania pochodzi z wód powierzchniowych lub gruntowych, należy dokonać pomiaru przewodności i zawartości całkowitego węgla organicznego (TOC) lub chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT).

1.7.4. **Roztwory testowe**

Roztwory testowe o wybranych stężeniach są zwykle przygotowywane przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Roztwory podstawowe należy przygotowywać, rozpuszczając badaną substancję w wodzie do rozcieńczania. Jeśli to tylko możliwe, należy unikać stosowania rozpuszczalników, emulgatorów czy środków dyspergujących. W niektórych przypadkach takie związki mogą być jednak potrzebne do przygotowania roztworu podstawowego o odpowiednim stężeniu. Informacje na temat odpowiednich rozpuszczalników, emulgatorów i środków dyspergujących podano w (4). W żadnym przypadku substancja badana w roztworach testowych nie powinna przekraczać granicy rozpuszczalności w wodzie do rozcieńczania.

Badanie powinno być przeprowadzone bez regulacji pH. Jeśli pH nie utrzymuje się w przedziale 6–9, można przeprowadzić drugie badanie przed dodaniem badanej substancji, dostosowując pH roztworu podstawowego do pH wody do rozcieńczania. Dostosowanie pH powinno zostać przeprowadzone w taki sposób, żeby stężenie roztworu podstawowego nie zostało istotnie zmienione i nie została spowodowana żadna reakcja chemiczna lub wytrącenie badanej substancji. Zaleca się stosowanie HCl i NaOH.

▼B

1.8. PROCEDURA

1.8.1. **Warunki ekspozycji**

1.8.1.1. *Grupy badane i kontrolne*

Naczynia do badania są napełniane odpowiednimi objętościami wody do rozcieńczania i roztworami badanych substancji. Stosunek powietrza do wody w naczyniu powinien być identyczny w grupie kontrolnej i badanej. Rozwielitki są następnie umieszczane w naczyniach do badania. Dla każdego badanego stężenia i kontroli należy użyć co najmniej 20 zwierząt podzielonych na cztery grupy po pięć zwierząt w każdej. Na każde zwierzę powinno przypadać co najmniej 2 ml roztworu badanego (tj. roztwór o objętości 10 ml dla pięciu rozwielitek na naczynie do badania). Badanie może być przeprowadzane przy zastosowaniu odnawiania semistatycznego lub przepływu przez system, jeśli badana substancja nie jest stabilna.

Oprócz właściwych serii kontrolnych należy przeprowadzić jedną serię kontrolną wody do rozcieńczania i, jeśli jest to właściwe, jedną serię kontrolną zawierającą czynnik rozpuszczający.

1.8.1.2. *Badane stężenia*

Jeśli nie ma danych o toksyczności badanej substancji, można przeprowadzić badanie zakresu, pozwalające określić zakres stężeń stosowanych w ostatecznych badaniach. W tym celu rozwielitki umieszcza się w szeregu roztworów o znacznie różniących się od siebie stężeniach badanej substancji. Działaniu każdego ze stężeń przez 48 godzin lub mniej powinno być poddanych pięć rozwielitek, żadne powtórzenia nie są konieczne. Okres ekspozycji może być krótszy (np. 24 godzin lub mniej), jeśli dane odpowiednie do celów badania określającego zakres stężeń można uzyskać w krótszym okresie.

Należy zastosować co najmniej pięć stężeń. Powinny one tworzyć szereg geometryczny, najlepiej o stosunku stężeń nieprzekraczającym 2,2. Jeśli zastosowano mniej niż pięć stężeń, należy przedstawić uzasadnienie. Najlepiej jeśli najwyższe badane stężenie powoduje stuprocentowe unieruchomienie, a najniższe badane stężenie nie powoduje widocznych skutków.

1.8.1.3. *Warunki inkubacji*

Temperatura powinna mieścić się w przedziale 18–22 ^{o}C i w żadnym badaniu nie powinna zmieniać się o więcej niż ± 1 ^{o}C. Zaleca się cykl 16 godzin oświetlenia, 8 godzin ciemności. Całkowita ciemność również jest dopuszczalna, zwłaszcza w przypadku badanych substancji niestabilnych w świetle.

W czasie badania nie należy doprowadzać powietrza do naczyń do badania. Badanie powinno być przeprowadzone bez regulacji pH. W czasie badania rozwielitki nie powinny być karmione.

1.8.1.4. *Czas trwania*

Czas trwania badania wynosi 48 godzin.

1.8.2. **Obserwacje**

W każdym naczyniu do badania należy sprawdzać obecność unieruchomionych rozwielitek po 24 i 48 godzinach od rozpoczęcia badania (definicje zamieszczono w części 1.2). Poza unieruchomieniem należy odnotować wszelkie odchylenia od normy w zachowaniu lub wyglądzie.

▼B

1.8.3. **Pomiary analityczne**

Zawartość tlenu rozpuszczonego i pH mierzy się na początku i na końcu badania w kontroli(-ach) i w roztworze badanej substancji o największym stężeniu. Stężenie tlenu rozpuszczonego w roztworach kontrolnych powinno spełniać kryterium ważności (zob. część 1.6). W normalnych warunkach pH nie powinno się różnić w poszczególnych badaniach o więcej niż 1,5 jednostki. Pomiary temperatury przeprowadza się zwykle w naczyniach kontrolnych i w ich otaczającym powietrzu. Temperaturę najlepiej mierzyć stale w czasie trwania badania lub przynajmniej na początku i na końcu badania.

Stężenie badanej substancji powinno być mierzone przynajmniej w roztworach badanych o najwyższym i o najniższym stężeniu, na początku i na końcu badania (4). Zaleca się, aby wyniki opierały się na mierzonych stężeniach. Jeśli jednak istnieją dane wskazujące, że stężenie badanej substancji jest skutecznie utrzymywane w granicach ± 20 % wartości nominalnej lub zmierzonej wartości początkowej przez cały czas trwania badania, to wyniki mogą opierać się na wartości nominalnej lub zmierzonej wartości początkowej.

1.9. BADANIE GRANICZNE

Stosując procedury opisane w niniejszej metodzie, można przeprowadzić badanie graniczne przy stężeniu 100 mg/l badanej substancji lub w stężeniu do granicy rozpuszczalności w środku stosowanym w badaniu (zależnie od tego, która wartość jest niższa) w celu wykazania, że EC_{50} jest większe niż dane stężenie. Badanie graniczne powinno być przeprowadzone przy użyciu 20 rozwielitek (najlepiej podzielonych na cztery grupy po pięć osobników) i tej samej liczby zwierząt w kontroli. Jeśli nastąpi unieruchomienie, należy przeprowadzić pełne badanie. Należy zanotować wszystkie odchylenia od normy w zachowaniu.

2. **DANE**

Dane powinny być podsumowane w formie tabelarycznej, dla każdej grupy badanej i kontrolnej przy każdej obserwacji należy podać liczbę użytych rozwielitek i unieruchomienie. Procent osobników unieruchomionych po 24 i 48 godzinach jest przedstawiany w funkcji stężenia badania. Dane są analizowane przy użyciu właściwych metod statystycznych (np. analiza probitowa itd.) w celu obliczenia nachylenia krzywych i EC_{50} przy 95 % poziomie ufności ($p = 0,05$) (7)(8).

W przypadku gdy standardowe metody obliczania EC_{50} nie mają zastosowania do otrzymanych danych, do oszacowania EC_{50} należy zastosować najwyższe stężenie niepowodujące unieruchomienia i najniższe stężenie powodujące 100 % unieruchomienia (wartość tę oblicza się jako średnią geometryczną tych dwóch stężeń).

3. **SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące dane:

Badana substancja:

— cechy fizyczne i istotne właściwości fizykochemiczne,

▼B

— chemiczne dane identyfikacyjne, w tym czystość.

Badany gatunek:

— źródło i gatunek *Daphnia*, dostawca (jeśli znany) i zastosowane warunki hodowli (w tym źródło, rodzaj i ilość pożywienia, częstotliwość karmienia).

Warunki badania:

— opis naczyń do badania: typ naczyń, objętość roztworu, liczba rozwielitek w naczyniu do badania, liczba naczyń do badania (powtórzeń) dla każdego stężenia,

— metody przygotowania roztworu podstawowego i badanych roztworów, w tym zastosowanie wszelkich rozpuszczalników lub środków dyspergujących,

— szczegółowe informacje o wodzie do rozcieńczania: źródło i właściwości wody (pH, twardość, stosunek Ca/Mg, stosunek Na/K, zasadowość, przewodność itd.); skład regenerowanej wody, jeśli taka jest stosowana,

— warunki inkubacji: temperatura, natężenie i cykliczność oświetlenia, rozpuszczony tlen, pH itd.

Wyniki:

— liczba i procent rozwielitek, które były unieruchomione lub wykazywały jakiekolwiek objawy niekorzystnego działania substancji (w tym zachowanie odbiegające od normy) w roztworach kontrolnych i badanych przy okazji każdej obserwacji, oraz opis charakteru obserwowanych zmian,

— wyniki i dane badania przeprowadzonego z substancja odniesienia, jeśli takie dane są dostępne,

— nominalne stężenia badania i wynik wszystkich analiz służących określeniu stężenia badanej substancji w naczyniach do badania; należy również przedstawić informacje o wydajności stosowanej metody oraz dokładności oznaczania,

— wyniki wszystkich pomiarów parametrów fizykochemicznych temperatury, pH i zawartości rozpuszczonego tlenu przeprowadzonych w czasie badania,

— EC_{50} po 48 godzinach dla unieruchomienia wraz z przedziałami ufności i wykresy dopasowanego modelu użytego do obliczeń, nachylenia krzywych odpowiedzi na dawkę i ich błąd standardowy; procedury statystyczne użyte do określenia EC_{50} (dane dla unieruchomienia po 24 godzinach powinny także być przedstawione, jeżeli były rejestrowane),

— wyjaśnienie wszelkich odstępstw od metody badania oraz określenie czy te odstępstwa miały wpływ na wyniki badań.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(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. Nr. 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. Pp. 65–84.

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

ZAŁĄCZNIK 1

NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE NADAJĄCEJ SIĘ DO BADAŃ WODY DO ROZCIEŃCZANIA

Substancja	Stężenie
Pył zawieszony	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 mg/l
Amoniak niezjonizowany	< 1 µg/l
Chlor resztkowy	< 10 µg/l
Pestycydy fosforoorganiczne razem	< 50 ng/l
Pestycydy grupy węglowodorów chlorowanych razem plus polichlorowane bifenyle	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l

▼B

ZAŁĄCZNIK 2

PRZYKŁADY WŁAŚCIWEJ REGENEROWANEJ WODY DO BADANIA

Woda do badania ISO (1)

Roztwory podstawowe (pojedyncza substancja)		W celu przygotowania zregenerowanej wody dodać następujące objętości roztworów podstawowych do 1 litra wody (*)
Substancja	Ilość dodawana do 1 litra wody (*)	
Chlorek wapnia $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Siarczan magnezu $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Wodorowęglan sodu $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Chlorek potasu KC1	0,23 g	25 ml

(*) Woda o odpowiedniej czystości, np. dejonizowana, destylowana lub poddana osmozie odwróconej, najlepiej mająca przewodność nieprzekraczającą 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Pożywki Elendta M7 i M4

Aklimatyzacja do pożywek Elendta M4 i M7

W niektórych laboratoriach napotkano trudności przy przenoszeniu rozwielitek do pożywek M4 i M7. Osiągnięto jednak pewne pomyślne wyniki, stosując aklimatyzację stopniową, tzn. przenosząc rozwielitki z własnej pożywki do 30 % roztworu, następnie do 60 %, a później 100 % roztworu Elendta. Konieczne może być stosowanie okresu aklimatyzacji nawet przez miesiąc.

Przygotowanie

Pierwiastki śladowe

Najpierw przygotowuje się osobne roztwory podstawowe (I) poszczególnych pierwiastków śladowych w wodzie o odpowiedniej czystości, np. dejonizowanej, destylowanej lub poddanej osmozie odwróconej. Z poszczególnych roztworów podstawowych (I) przygotowywany jest drugi, pojedynczy, roztwór podstawowy (II), który zawiera wszystkie elementy śladowe (roztwór łączony), tj.:

Roztwor podstawowy (pojedyncza substancja)	Ilość dodana do wody (mg/l)	Stężenie (odnoszące się do pożywki M4)	W celu przygotowania kombinowanego roztworu II dodać następujące ilości roztworu podstawowego I do wody (ml/1)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000-krotne	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000-krotne	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-krotne	1,0	0,25

▼B

Roztwor podstawowy (pojedyncza substancja)	Ilość dodana do wody (mg/l)	Stężenie (odnoszące się do pożywki M4)	W celu przygotowania kombinowanego roztworu II dodać następujące ilości roztworu podstawowego I do wody (ml/1)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000-krotne	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000-krotne	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-krotne	1,0	0,25
$Na_2MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000-krotne	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000-krotne	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-krotne	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000-krotne	1,0	1,0
KI	65	20 000-krotne	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000-krotne	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-krotne	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000-krotne	—	—
$FeS0_4.7H_2O$	1 991	2 000-krotne	—	—

Zarowno roztwor Na 2 EDTA jak i $FeSO_4$ są przygotowywane oddzielnie, zlevane razem i niezwłocznie umieszczane w autoklawie.

Daje to:

roztwor 21 Fe-EDT		1 000-krotne	20,0	5,0

Pożywki M4 i M7

Pożywki M4 i M7 są przygotowywane przy użyciu roztworu podstawowego II, makroskładników i witamin w następujący sposób:

	Ilość dodana do wody (mg/l)	Stężenie (odnoszące się do pożywki M4)	Ilość roztworu p odstawowego II dodanego w celu otrzymania pożywkki (ml/1)	
			M4	M7
Roztwor podstawowy II (połączone pierwiastki śladowe)		20-krotne	50	50
Roztwory podstawowe makroskładników (pojedyncza substancja)				
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1 000-krotne	1,0	1,0
$MgS0_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000-krotne	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-krotne	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-krotne	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000-krotne	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-krotne	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-krotne	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-krotne	0,1	0,1

▼B

	Ilość dodana do wody (mg/l)	Stężenie (odnoszące się do pożywki M4)	Ilość roztworu p odstawowego II dodanego w celu otrzymania pożywkki (ml/1)	
			M4	M7
Łączony roztwór podstawowy witamin	—	10 000-krotne	0,1	0,1
Łączony roztwor podstawowy witamin przygotowuje się przez dodanie 3 witamin do 1 litra wody, jak przedstawiono poniżej.				
Hydrochlorek tiaminy	750	10 000-krotne		
Cyjanokobalami na (B_{12})	10	10 000-krotne		
Biotyna	7,5	10 000-krotne		

Roztwór podstawowy złożony z witamin jest przechowywany zamrożony w niewielkich alikwotach. Witaminy są dodawane do pożywki na krótko przed użyciem.

UWAGA: Aby uniknąć wytrącania się soli w czasie przygotowywania kompletnych pożywek, dodać alikwoty roztworów podstawowych do około 500–800 ml dejonizowanej wody, a następnie uzupełnić do 1 litra.

UWAGA: Informacje o pierwszej publikacji na temat pożywki M4 można znaleźć w pracy Elendt B.P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M6

C.3. BADANIE ZAHAMOWANIA WZROSTU SŁODKOWODNYCH GLONÓW I CYJANOBAKTERII

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 201 (2006, załącznik skorygowany w 2011). Stwierdzono potrzebę rozszerzenia zakresu tej metody badawczej, tak aby objąć nią dodatkowe gatunki i zaktualizować ją, by spełniała wymagania w zakresie oceny zagrożenia oraz klasyfikacji substancji chemicznych. Korekty dokonano na podstawie szerokich doświadczeń praktycznych, postępu naukowego w dziedzinie badań nad toksycznością glonów oraz rozległego zastosowania regulacyjnego, które nastąpiło od czasu pierwotnego przyjęcia.

2. Zastosowane definicje są podane w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

3. Celem niniejszego badania jest określenie wpływu substancji chemicznej na wzrost słodkowodnych mikroglonów lub cyjanobakterii. Użyte do badania rosnące wykładniczo organizmy naraża się na działanie badanej substancji chemicznej w kulturach statycznych przez okres wynoszący zwykle 72 godziny. Pomimo stosunkowo krótkiego czasu trwania badania, skutki można ocenić na przestrzeni kilku pokoleń.

4. Reakcja układu polega na ograniczeniu wzrostu w szeregu kultur glonów (badanych jednostek) narażonych na działanie różnych stężeń badanej substancji chemicznej. Reakcję ocenia się jako funkcję stężenia ekspozycyjnego w odniesieniu do średniego wzrostu kultur w kontrpróbach kontrolnych niepoddanych narażeniu. W celu pełnego wyrażenia reakcji układu na skutki toksyczne (dla zapewnienia optymalnej wrażliwości) kulturom umożliwia się nieograniczony wzrost wykładniczy w dostatecznych warunkach odżywczych i przy stałym świetle przez okres wystarczający do pomiaru zmniejszenia właściwej szybkości wzrostu.

5. Wzrost i zahamowanie wzrostu określa się ilościowo poprzez pomiary biomasy glonów w funkcji czasu. Biomasę glonów określa się jako suchą masę przypadającą na objętość, np. mg glonów/litr roztworu do badań. Sucha masa jest jednak trudna do zmierzenia i w związku z tym używa się parametrów zastępczych. Ze wspomnianych parametrów zastępczych najczęściej używa się liczby komórek. Do innych takich parametrów należy objętość komórek, fluorescencja, gęstość optyczna itp. Należy znać przelicznik pomiędzy mierzonym parametrem zastępczym a biomasą.

6. Punktem końcowym badania jest zahamowanie wzrostu wyrażone jako logarytmiczny przyrost biomasy (średnia właściwa szybkość wzrostu) w okresie narażenia. Na podstawie średniej właściwej szybkości wzrostu zarejestrowanej w serii roztworów do badań wyznacza się stężenie powodujące zahamowanie szybkości wzrostu o określoną wartość procentową (np. 50 %) i wyraża się je jako E_rC_x (np. E_rC_{50}).

7. Dodatkową zmienną zależną użytą w niniejszej metodzie badawczej jest przyrost, który może być potrzebny do spełnienia określonych wymagań regulacyjnych w niektórych krajach. Jest on określony jako biomasa na końcu okresu narażenia minus biomasa na początku okresu narażenia. Na podstawie uzysku zarejestrowanego w serii roztworów do badań oblicza się stężenie powodujące zahamowanie przyrostu o określone x % (np. 50 %) i wyraża się je jako E_yC_x (np. E_yC_{50}).

8. Ponadto można statystycznie określić najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), oraz stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC).

▼M6

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

9. Informacje na temat badanej substancji chemicznej, które mogą być przydatne przy ustalaniu warunków badania, obejmują wzór strukturalny, czystość, stabilność w świetle, stabilność w warunkach badania, właściwości pochłaniania światła, stałą dysocjacji oraz wyniki badań przemiany, w tym biodegradowalność w wodzie.

10. Należy znać rozpuszczalność w wodzie, współczynnik podziału oktanol/woda (P_{ow}) oraz prężność pary badanej substancji chemicznej i powinna być dostępna potwierdzona metoda określania ilościowego substancji chemicznej w roztworach do badań z podaną wydajnością odzysku i granicą wykrywalności.

WAŻNOŚĆ BADANIA

11. Aby badanie było ważne, powinny być spełnione następujące kryteria wykonania:

— Biomasa w kulturach kontrolnych powinna wzrosnąć wykładniczo co najmniej 16-krotnie w ciągu 72-godzinnego okresu badania. Odpowiada to właściwej szybkości wzrostu wynoszącej 0,92 dnia^{-1}. W przypadku najczęściej stosowanych gatunków szybkość wzrostu jest zazwyczaj znacznie większa (zob. dodatek 2). Kryterium to może nie być spełnione, gdy stosuje się gatunki, które wzrastają wolniej niż wymienione w dodatku 2. W takim przypadku okres badania można przedłużyć, aby uzyskać co najmniej 16-krotny wzrost w kulturach kontrolnych, przy czym wzrost musi być wykładniczy w całym okresie badania. Okres badania można skrócić do co najmniej 48 godzin, aby utrzymać nieograniczony wzrost wykładniczy w trakcie badania, pod warunkiem że osiągnięty zostanie co najmniej 16-krotny wzrost.

— Średni współczynnik zmienności w przypadku właściwej szybkości wzrostu dla poszczególnych odcinków (dni 0–1, 1–2 i 2–3 w przypadku 72-godzinnych badań) w kulturach kontrolnych (zob. dodatek 1 pod hasłem „współczynnik zmienności") nie może przekraczać 35 %. Obliczanie właściwej szybkości wzrostu dla poszczególnych odcinków przedstawiono w pkt 49. Kryterium to ma zastosowanie do średniej wartości współczynników zmienności obliczonej dla kontrprób kultur kontrolnych.

— Współczynnik zmienności średniej właściwej szybkości wzrostu w ciągu całego okresu badania w kontrpróbach kultur kontrolnych nie może przekroczyć 7 % w badaniach z udziałem Pseudokirchneriella subcapitata i Desmodesmus subspicatus. W przypadku innych rzadziej badanych gatunków wartość ta nie powinna przekraczać 10 %.

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

12. Sposobem sprawdzenia procedury badania może być zbadanie substancji chemicznych odniesienia, takich jak 3,5-dichlorofenol stosowany w międzynarodowym badaniu międzylaboratoryjnym (1). Jako substancję chemiczną odniesienia dla zielenic można również zastosować dichromian potasowy. Wskazane jest badanie substancji chemicznej odniesienia co najmniej dwa razy w roku.

ZASTOSOWANIE BADANIA

13. Niniejsza metoda badawcza jest najłatwiejsza do stosowania w odniesieniu do substancji chemicznych rozpuszczalnych w wodzie, które w warunkach badania prawdopodobnie pozostaną w wodzie. W przypadku badania substancji lotnych, silnie adsorbujących, zabarwionych, mających niską rozpuszczalność w wodzie, lub substancji chemicznych, które mogą wpływać na dostępność

▼M6

składników pokarmowych lub minerałów w pożywce, mogą być wymagane pewne modyfikacje opisywanej procedury (np. układ zamknięty, kondycjonowanie naczyń badawczych). Wskazówki dotyczące pewnych stosownych modyfikacji podano w (2), (3) i (4).

OPIS METODY BADAWCZEJ

Aparatura

14. Naczynie badawcze i inna aparatura, która wchodzi w kontakt z roztworami do badań, powinny być wykonane całkowicie ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału. Sprzęt należy gruntownie umyć, aby żadne zanieczyszczenia organiczne lub nieorganicznie nie zakłócały wzrostu glonów ani składu roztworów do badań.

15. Naczyniami badawczymi są zwykle kolby szklane o wymiarach umożliwiających uzyskanie dostatecznej objętości kultury do pomiarów podczas badania i na wystarczające przenikanie masy CO_2 z atmosfery (zob. pkt 30). Należy zauważyć, że objętość cieczy musi być wystarczająca dla oznaczeń analitycznych (zob. pkt 37).

16. Ponadto wymagane mogą być niektóre lub wszystkie spośród następujących urządzeń:

— urządzenia do hodowli kultur: zalecana jest kabina lub komora, w której wybrana temperatura inkubacji może być utrzymywana w granicach ± 2 °C;

— przyrządy do pomiaru światła: należy zauważyć, że na wartość pomiarową będzie mieć wpływ metoda pomiaru natężenia światła, w szczególności typ receptora (kolektora). Pomiary należy wykonywać najlepiej przy użyciu receptora sferycznego (4 π) (który reaguje na bezpośrednie i odbite światło ze wszystkich kątów powyżej i poniżej płaszczyzny pomiaru) lub receptora 2 π (który reaguje na światło ze wszystkich kątów powyżej płaszczyzny pomiaru);

— aparatura do określania biomasy glonów. Pomiaru liczby komórek, która jest najczęściej stosowanym parametrem zastępczym dla biomasy glonów, można dokonać za pomocą elektronicznego licznika cząstek, mikroskopu z komorą do liczenia oraz cytometru przepływowego. Inne parametry zastępcze biomasy można mierzyć za pomocą cytometru przepływowego, fluorymetru, spektrofotometru lub kolorymetru. Pomocny w obliczeniu jest przelicznik wiążący liczbę komórek z suchą masą. W celu zapewnienia przydatnych pomiarów przy niskich stężeniach biomasy, gdy używa się spektrofotometru, niezbędne może być użycie kuwet o długości ścieżki światła wynoszącej co najmniej 4 cm.

Organizmy użyte do badania

17. Można użyć kilku gatunków niezwiązanych mikroglonów i cyjanobakterii. Wykazano, że w przypadku stosowania procedury badania określonej w niniejszej metodzie badawczej odpowiednie są szczepy wymienione w dodatku 2.

18. Jeżeli wykorzystuje się inne gatunki, należy podać szczep lub pochodzenie. Należy potwierdzić, że przez cały okres badania w panujących warunkach można utrzymać wykładniczy wzrost glonów użytych do badania.

Pożywka

19. Zaleca się dwie alternatywne pożywki – pożywkę OECD i pożywkę AAP. Składy tych pożywek przedstawiono w dodatku 3. Należy zwrócić uwagę, że początkowa wartość pH i pojemność buforowa (regulowanie wzrostu pH) tych dwóch pożywek są różne. Dlatego wyniki badań mogą być różne, w zależności od użytej pożywki, zwłaszcza gdy badane są jonizujące substancje chemiczne.

▼M6

20. Do niektórych celów, np. gdy bada się metale i czynniki chelatujące lub gdy wykonuje się badanie przy różnych wartościach pH, konieczna może być modyfikacja pożywki wzrostowej. Użycie zmodyfikowanej pożywki należy szczegółowo opisać i uzasadnić (3) (4).

Stężenie początkowej biomasy

21. Początkowa biomasa w badanych kulturach musi być taka sama we wszystkich badanych kulturach i dostatecznie mała, aby umożliwić wzrost wykładniczy w całym okresie inkubacji bez ryzyka wyczerpania składników pokarmowych. Początkowa biomasa nie może przekraczać 0,5 mg/l w przeliczeniu na suchą masę. Zaleca się następujące początkowe stężenia komórek:

Pseudokirchneriella subcapitata	$5 \times 10^3 - 10^4$ komórek/ml
Desmodesmus subspicatus	$2–5 \times 10^3$ komórek/ml
Navicula pelliculosa	10^4 komórek/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 komórek/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 - 10^5$ komórek/ml

Stężenia badanej substancji chemicznej

22. Zakres stężenia, w którym mogą wystąpić skutki, można wyznaczyć na podstawie wyników badań ustalających zakres. Do końcowego badania ostatecznego należy wybrać co najmniej pięć stężeń uporządkowanych w szereg geometryczny, w którym każde kolejne stężenie jest co najwyżej 3,2 raza wyższe od poprzedniego. W przypadku badanych substancji chemicznych wykazujących płaską krzywą zależności stężenie-odpowiedź uzasadnione może być zastosowanie wyższej krotności. Zaleca się, aby szereg stężeń obejmował zakres powodujący zahamowanie tempa wzrostu glonów o 5–75 %.

Kontrpróby i próby kontrolne

23. Projekt badania powinien obejmować trzy kontrpróby przy każdym badanym stężeniu. Jeżeli wyznaczenie NOEC nie jest wymagane, projekt badania można zmienić, zwiększając liczbę stężeń i zmniejszając liczbę kontrprób przypadających na stężenie. Liczba kontrprób kontrolnych musi wynosić co najmniej trzy, a najlepiej powinna być dwukrotnie większa od liczby kontrprób użytych w przypadku każdego badanego stężenia.

24. Do analitycznych oznaczeń stężeń badanej substancji chemicznej można sporządzić oddzielny zestaw roztworów do badań (zob. pkt 36 i 38).

25. Gdy do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej używa się rozpuszczalnika, wówczas w projekcie badania należy przewidzieć dodatkowe próby kontrolne zawierające rozpuszczalnik o takim samym stężeniu jak w badanych kulturach.

Przygotowanie kultury inokulum

26. W celu przystosowania badanych glonów do warunków badania oraz dopilnowania, aby znajdowały się one w fazie wzrostu wykładniczego, gdy są użyte do inokulacji roztworów do badań, kulturę inokulum w pożywce przygotowuje się 2–4 dni przez rozpoczęciem badania. Biomasę glonów należy dostosować, aby umożliwić przeważanie wzrostu wykładniczego w kulturze inokulum do

▼M6

czasu rozpoczęcia badania. Kulturę inokulum inkubuje się w takich samych warunkach jak kultury do badania. Należy zmierzyć przyrost biomasy w kulturze inokulum, aby upewnić się, że wzrost zawiera się w normalnym zakresie dla badanego szczepu w warunkach hodowli. Przykładową procedurę hodowli glonów opisano w dodatku 4. Aby uniknąć synchronicznego podziału komórek podczas badania, wymagany może być drugi etap reprodukowania kultury inokulum.

Sporządzenie roztworów do badań

27. Wszystkie roztwory do badań muszą zawierać takie same stężenia pożywki i taką samą początkową biomasę glonów do badania. Roztwory do badań o wybranych stężeniach sporządza się zwykle przez zmieszanie roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej z pożywką i kulturą inokulum. Roztwory podstawowe sporządza się zwykle, rozpuszczając substancję chemiczną w pożywce.

28. Aby dodać do pożywki substancje chemiczne o małej rozpuszczalności w wodzie jako nośniki można użyć rozpuszczalników, np. acetonu, alkoholu t-butylowego i dimetyloformamidu (2)(3). Stężenie rozpuszczalnika nie powinno przekraczać 100 µl/l i takie samo stężenie rozpuszczalnika należy dodać do wszystkich kultur (w tym z próbami kontrolnymi) w badanej serii.

Inkubacja

29. Należy przykryć naczynia badawcze korkami przepuszczającymi powietrze. Naczynia wstrząsa się i umieszcza w urządzeniu do hodowli kultur. Podczas badania niezbędne jest utrzymanie glonów w zawiesinie i umożliwienie wnikania CO_2. W tym celu należy stosować ciągłe wstrząsanie lub mieszanie. Kultury należy utrzymywać w temperaturze 21–24 °C, regulowanej z dokładnością do ± 2 °C. Dla gatunków innych niż wymienione w dodatku 2, np. gatunków tropikalnych, odpowiednie mogą być wyższe temperatury, pod warunkiem że spełnione będą kryteria ważności. Zaleca się rozmieścić kolby losowo i codziennie zmieniać ich położenie w inkubatorze.

30. Wartość pH pożywki kontrolnej nie powinna wzrosnąć w trakcie badania o więcej niż 1,5 jednostki. W przypadku metali i substancji chemicznych, które częściowo jonizują się przy pH zbliżonym do pH badania, konieczne może być ograniczenie odchylenia pH w celu otrzymania odtwarzalnych i jednoznacznych wyników. Odchylenie rzędu < 0,5 jednostek pH jest technicznie wykonalne i można je osiągnąć, zapewniając należytą szybkość wnikania masy CO_2 z otaczającego powietrza do roztworu do badań, np. przez zwiększanie szybkości wstrząsania. Inną możliwością jest zmniejszenie zapotrzebowania na CO_2 przez zmniejszenie początkowej biomasy albo skrócenie czasu trwania badania.

31. Powierzchnia, na której następuje inkubacja kultur, powinna mieć zapewnione ciągłe, równomierne oświetlenie fluorescencyjne np. typu „chłodnego światła białego” albo „światła dziennego”. Szczepy glonów i cyjanobakterii różnią się pod względem zapotrzebowania na światło. Natężenie światła należy dobrać w taki sposób, aby odpowiadało ono organizmowi użytemu do badania. Dla zalecanych gatunków zielenic należy wybrać natężenie światła na poziomie roztworów do badań w przedziale 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, zmierzone w czynnym fotosyntetycznie zakresie długości fal 400–700 nm przy użyciu odpowiedniego receptora. Niektóre gatunki, w szczególności *Anabaena flos-aquae*, rosną dobrze przy niższych natężeniach światła, a przy wyższych mogą ulec uszkodzeniu. Dla takich gatunków należy wybrać średnie natężenie światła w zakresie 40–60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (W przypadku przyrządów do pomiaru światła kalibrowanych w luksach zalecanemu natężeniu światła 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ odpowiada w przybliżeniu równoważny zakres 4 440–8 880 luksów dla chłodnego światła białego). Natężenie światła należy utrzymywać w zakresie ± 15 % od średniego natężenia światła na powierzchni inkubacji.

▼M6

Czas trwania badania

32. Badanie zwykle trwa 72 godzin. Można jednak zastosować krótsze albo dłuższe okresy trwania badania, pod warunkiem że spełnione mogą zostać kryteria ważności podane w pkt 11.

Pomiary i oznaczenia analityczne

33. Biomasę glonów w każdej kolbie ustala się co najmniej raz dziennie w okresie badania. Jeżeli pomiary dokonywane są na małych objętościach pobranych z roztworu do badań za pomocą pipety, wówczas objętości takich nie należy uzupełniać.

34. Pomiar biomasy wykonuje się poprzez ręczne zliczanie komórek za pomocą mikroskopu lub elektronicznego licznika cząstek (określając liczbę komórek lub objętość). Można zastosować alternatywne techniki, np. cytometrię przepływową, fluorescencję chlorofilu *in vitro* albo *in vivo* (5) (6) lub gęstość optyczną, pod warunkiem że można wykazać zadowalającą korelację z biomasą w całym zakresie biomasy występującym w badaniu.

35. Należy zmierzyć pH roztworów na początku i na końcu badania.

36. Jeśli dostępna jest procedura analityczna dla oznaczania badanej substancji chemicznej w zastosowanym zakresie stężenia, roztwory do badań należy poddać analizie celem sprawdzenia początkowych stężeń i utrzymania stężeń ekspozycyjnych w trakcie badania.

37. Analiza stężenia badanej substancji chemicznej na początku i końcu badania niskiego i wysokiego badanego stężenia oraz stężenia zbliżonego do oczekiwanego EC_{50} może być wystarczająca, jeśli prawdopodobne jest, że stężenia ekspozycyjne będą odbiegać od wartości nominalnych w trakcie badania o mniej niż 20 %. Gdy natomiast jest mało prawdopodobne, że stężenia pozostaną w granicach 80–120 % stężenia nominalnego, zaleca się analizę wszystkich badanych stężeń na początku i końcu badania. W przypadku badania substancji chemicznych lotnych, nietrwałych lub silnie adsorbujących zaleca się dodatkowe pobieranie próbek do analizy w odstępach 24-godzinnych w ciągu okresu narażenia, aby dokładniej ustalić stratę badanej substancji chemicznej. W przypadku tych substancji chemicznych konieczne mogą okazać się dodatkowe kontrpróby. We wszystkich przypadkach oznaczenie stężeń badanej substancji chemicznej musi być wykonywane tylko na jednym naczyniu z kontrpróbą przy każdym badanym stężeniu (lub na połączonych zawartościach naczyń z kontrpróbą).

38. Pożywki sporządzone specjalnie do analizy stężeń ekspozycyjnych podczas badania należy potraktować dokładnie tak samo jak pożywki użyte do badania, tzn. należy je zaszczepić glonami i inkubować w identycznych warunkach. Jeżeli wymagana jest analiza stężenia rozpuszczonej badanej substancji chemicznej, konieczne może być oddzielenie glonów od pożywki. Oddzielenia należy dokonać najlepiej przez odwirowanie przy małej sile grawitacji, wystarczającej do osadzenia się glonów.

39. Jeżeli istnieją dowody, że stężenie badanej substancji chemicznej zostało zadowalająco utrzymane w granicach ± 20 % nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia w ciągu całego badania, to analizę wyników można oprzeć na nominalnych lub zmierzonych początkowych wartościach. Jeśli odchylenie od nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia nie mieści się w zakresie ± 20 %, to analizę wyników należy oprzeć na średnim geometrycznym stężeniu w ciągu narażenia lub na modelach opisujących spadek stężenia badanej substancji chemicznej (3) (7).

▼M6

40. Badanie zahamowania wzrostu glonów odbywa się w bardziej dynamicznym układzie badawczym niż większość innych krótkookresowych badań toksyczności dla organizmów wodnych. W rezultacie faktyczne stężenia ekspozycyjne mogą być trudne do określenia, zwłaszcza dla adsorbujących substancji chemicznych badanych w niskich stężeniach. W takich przypadkach zniknięcie badanej substancji chemicznej z roztworu przez adsorpcję do rosnącej masy glonów nie oznacza jej utraty z układu badawczego. Podczas analizy wyniku badania należy sprawdzić, czy zmniejszeniu stężenia badanej substancji chemicznej w trakcie badania towarzyszy spadek zahamowania wzrostu. Jeżeli tak się dzieje, można rozważyć zastosowanie odpowiedniego modelu opisującego spadek stężenia badanej substancji chemicznej (7). W przeciwnym razie wskazane może być przeprowadzenie analizy w oparciu o wyniki uzyskane przy początkowych (nominalnych lub zmierzonych) stężeniach.

Pozostałe obserwacje

41. Należy przeprowadzić obserwacje mikroskopowe w celu sprawdzenia, czy wygląd kultury inokulum jest normalny i zdrowy oraz zaobserwowania ewentualnego nietypowego wyglądu glonów (który może być spowodowany narażeniem na badaną substancję chemiczną) na końcu badania.

Badanie graniczne

42. W niektórych okolicznościach, na przykład gdy badanie wstępne wskazuje, że badana substancja chemiczna nie ma skutków toksycznych w stężeniach do 100 mg/l lub do jej rozpuszczalności granicznej w pożywce (w zależności od tego, która wartość jest niższa), można przeprowadzić badanie graniczne polegające na porównaniu reakcji w grupie kontrolnej i jednej grupie badanej (o stężeniu 100 mg/l lub równym granicznej rozpuszczalności). Zdecydowanie zaleca się, aby takie badanie było poparte analizą stężenia ekspozycyjnego. Do badania granicznego stosują się wszystkie poprzednio opisane warunki badania i kryteria ważności, z tym że liczba kontrprób poddawanych zabiegowi powinna wynosić co najmniej sześć. Zmienne zależne w grupie badanej i w grupie kontrolnej można analizować przy użyciu testu statystycznego do porównywania średnich, np. testu t-Studenta. Jeżeli wariancje obydwu grup są nierówne, należy wykonać test t-Studenta dostosowany dla nierównych wariancji.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Wykreślenie krzywych wzrostu

43. Biomasa w naczyniach badawczych może być wyrażona w jednostkach parametru zastępczego użytego do pomiaru (np. liczby komórek, fluorescencji).

44. Należy zestawić w postaci tabelarycznej oszacowane stężenie biomasy w badanych kulturach i w kontrolnych wraz ze stężeniami badanego materiału i czasami pomiaru zarejestrowanymi z dokładnością co najmniej do pełnych godzin, aby sporządzić wykresy krzywych wzrostu. Na tym pierwszym etapie mogą być przydatne zarówno skale logarytmiczne, jak i liniowe, lecz skale logarytmiczne są obowiązkowe i na ogół dają lepszy obraz zmienności przebiegu wzrostu w okresie badania. Należy zwrócić uwagę, że wzrost wykładniczy w wyniku wykreślenia na skali logarytmicznej tworzy prostą linię, a nachylenie linii (kierunek i kąt nachylenia) oznacza właściwą szybkość wzrostu.

45. Za pomocą wykresów należy zbadać, czy kultury kontrolne wzrastają wykładniczo w spodziewanym tempie w trakcie całego badania. Należy krytycznie zbadać wszystkie punkty danych oraz wygląd wykresów i sprawdzić dane surowe i procedury pod kątem możliwych błędów. Należy sprawdzić w szczególności wszelkie punkty danych, które wydają się stanowić odchylenia spowodowane błędem systematycznym. Jeżeli jest oczywiste, że można stwierdzić lub uznać za wysoce prawdopodobne błędy proceduralne, to określony punkt danych oznacza się jako wartość oddaloną i nie ujmuje się go w późniejszej analizie statystycznej. (Zerowe stężenie glonów w jednym z dwóch lub trzech naczyń z kontrpróbą może oznaczać, że naczynie to nie zostało poprawnie zaszczepione lub że zostało niewłaściwie wyczyszczone). Powody odrzucenia punktu danych jako wartości oddalonej

▼M6

należy wyraźnie podać w sprawozdaniu z badania. Akceptowanymi powodami są wyłącznie (rzadkie) błędy proceduralne, a nie tylko niedostateczna dokładność. Procedury statystyczne dotyczące identyfikacji wartości oddalonych mają ograniczone zastosowanie do zagadnienia tego typu i nie mogą zastąpić wiedzy fachowej. Wskazane jest, aby wartości oddalone (zaznaczone jako takie) zachować wśród punktów danych przedstawionych w późniejszej graficznej lub tabelarycznej prezentacji danych.

Zmienne zależne

46. Celem badania jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na wzrost glonów. W niniejszej metodzie badawczej opisuje się dwie zmienne zależne, gdyż różne jurysdykcje mają różne preferencje i potrzeby regulacyjne. Aby wyniki badania były akceptowalne we wszystkich jurysdykcjach, wpływ należy ocenić przy użyciu obydwu zmiennych zależnych a) i b) opisanych poniżej.

a) średnia właściwa szybkość wzrostu: tę zmienną zależną oblicza się na podstawie logarytmicznego dziennego przyrostu biomasy w okresie badania;

b) przyrost: tą zmienną zależną jest biomasa na końcu badania po odjęciu początkowej biomasy.

47. Należy zauważyć, że wartości toksyczności obliczone przy użyciu tych dwóch zmiennych zależnych nie są porównywalne i różnicę tę należy uwzględnić przy wykorzystywaniu wyników badania. Jeżeli spełnione są warunki badania określone w niniejszej metodzie badawczej, wartości EC_x oparte na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_rC_x) będą zwykle wyższe od wyników opartych na przyroście (E_yC_x) ze względu na podstawę matematyczną tych podejść. Nie należy interpretować tego jako różnicy wrażliwości pomiędzy tymi dwiema zmiennymi zależnymi, lecz jedynie jako stwierdzenie, że wartości te są różne pod względem matematycznym. Pojęcie średniej właściwej szybkości wzrostu opiera się na ogólnym przebiegu wzrostu wykładniczego glonów w nieograniczonych kulturach, gdzie toksyczność szacuje się na podstawie wpływu na szybkość wzrostu, przy czym nie jest ona zależna od bezwzględnego poziomu właściwej szybkości wzrostu próby kontrolnej, nachylenia krzywej zależności stężenie-odpowiedź ani czasu trwania badania. Natomiast wyniki oparte na zmiennej zależnej w postaci przyrostu są zależne od wszystkich tych pozostałych zmiennych. E_yC_x jest zależne od właściwej szybkości wzrostu gatunków glonów użytych w każdym badaniu oraz od maksymalnej właściwej szybkości wzrostu, która może być różna dla różnych gatunków, a nawet dla różnych szczepów glonów. Tej zmiennej zależnej nie powinno się używać do porównywania wrażliwości na substancje toksyczne pomiędzy gatunkami glonów lub nawet różnymi ich szczepami. Choć z naukowego punktu widzenia preferuje się szacowanie toksyczności z wykorzystaniem średniej właściwej szybkości wzrostu, oszacowania toksyczności na podstawie przyrostu są również objęte niniejszą metodą badawczą, co pozwala spełnić obecne wymogi regulacyjne istniejące w niektórych krajach.

Średnia szybkość wzrostu

48. Średnią właściwą szybkość wzrostu dla konkretnego okresu oblicza się jako logarytmiczny przyrost biomasy z równania dla każdego naczynia z grupami kontrolnymi i próbami poddawanymi badaniu [1]:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{dzień}^{-1}) \qquad [1],$$

gdzie:

μ_{i-j} to średnia właściwa intensywność wzrostu od momentu *i* do j;

X_i to biomasa w czasie *i*;

X_j to biomasa w czasie *j*.

Dla każdej grupy badanej i kontrolnej należy obliczyć średnią wartość szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji.

49. Obliczyć średnią właściwą szybkość wzrostu w całym okresie badania (zwykle dni 0–3), wykorzystując nominalnie zaszczepioną biomasę jako wartość początkową zamiast zmierzonej wartości początkowej, ponieważ w ten sposób zwykle uzyskuje się większą dokładność. Jeżeli urządzenie używane do pomiaru biomasy pozwala na dostatecznie dokładne określenie małej biomasy inokulum (np. cytometr przepływowy), wówczas można użyć zmierzonego początkowego stężenia biomasy. Należy również ocenić szybkość wzrostu dla poszczególnych odcinków, obliczoną jako właściwa szybkość wzrostu dla każdego dnia w trakcie badania (dni 0–1, 1–2 i 2–3), oraz zbadać, czy szybkość wzrostu w grupie kontrolnej pozostaje stała (zob. kryteria ważności, pkt 11). Właściwa szybkość wzrostu znacząco niższa w pierwszym dniu od ogólnej średniej właściwej szybkości wzrostu może oznaczać fazę zwłoki. Podczas gdy fazę zwłoki można zminimalizować i praktycznie wyeliminować w kulturach kontrolnych przez odpowiednie rozmnożenie kultury pierwotnej, faza zwłoki w kulturach narażonych może oznaczać regenerację po początkowym wstrząsie toksycznym lub zmniejszonym narażeniu wskutek straty badanej substancji chemicznej (w tym jej sorpcji na biomasie glonów) po początkowym narażeniu. Stąd można określić szybkość wzrostu dla poszczególnych odcinków, aby ocenić skutki badanej substancji chemicznej występujące w ciągu okresu narażenia. Znaczące różnice pomiędzy szybkością wzrostu dla poszczególnych odcinków a średnia szybkością wzrostu świadczą o odchyleniu od stałego wzrostu wykładniczego i uzasadniają dokładne zbadanie krzywych wzrostu.

50. Należy obliczyć procentowe zahamowanie tempa wzrostu dla każdej kontrpróby poddawanej badaniu za pomocą równania [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

gdzie:

$\%\ I_r$ = procentowe zahamowanie średniej właściwej szybkości wzrostu;

μ_C = średnia wartość średniej właściwej szybkości wzrostu (μ) w grupie kontrolnej;

μ_T = średnia właściwa szybkość wzrostu dla kontrpróby poddawanej badaniu.

51. Jeżeli do sporządzenia roztworów do badań użyto rozpuszczalników, przy obliczaniu procentowego zahamowania należy użyć prób kontrolnych z rozpuszczalnikiem zamiast prób kontrolnych bez rozpuszczalnika.

Przyrost

52. Przyrost oblicza się jako biomasę na końcu badania po odjęciu biomasy na początku badania dla każdego naczynia z próbami kontrolnymi i badanymi. Dla każdego badanego stężenia i próby kontrolnej należy obliczyć średnią wartość przyrostu wraz z oszacowaniami wariancji. Dla każdej kontrpróby poddawanej badaniu można obliczyć procentowe zahamowanie przyrostu (% I_y) w następujący sposób:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

gdzie:

$\% I_y$ = procentowe zahamowanie przyrostu;

Y_C = średnia wartość przyrostu w grupie kontrolnej;

Y_T = wartość przyrostu dla badanej kontrpróby.

Wykreślenie krzywej zależności stężenie-odpowiedź

53. Należy wykreślić procentową wartość zahamowania w funkcji logarytmu stężenia badanej substancji chemicznej i dokładnie zbadać wykres, pomijając każdy punkt danych, który został potraktowany jako wartość oddalona w pierwszej fazie. Należy dopasować ciągłą linię pomiędzy punktami danych „na oko" lub za pomocą komputerowej interpolacji, aby uzyskać pierwsze wrażenie dotyczące zależności stężenie-odpowiedź, a następnie kontynuować z zastosowaniem bardziej szczegółowej metody, najlepiej komputerowej metody statystycznej. W zależności od zamierzonego wykorzystania danych, jakości (dokładności) i ilości danych, jak również dostępności narzędzi do analizy danych, można podjąć decyzję (co niekiedy będzie uzasadnione) o przerwaniu analizy danych na tym etapie i można po prostu odczytać główne wartości EC_{50} i EC_{10} (lub EC_{20}) z dopasowanej „na oko" krzywej (zob. również sekcja dotycząca skutków stymulujących poniżej). Niezastosowanie metody statystycznej może wynikać z następujących uzasadnionych powodów:

— dane nie są odpowiednie do tego, aby metody komputerowe przyniosły wyniki bardziej wiarygodne od uzyskanych na podstawie wiedzy fachowej – w takich sytuacjach niektóre programy komputerowe mogą nawet nie dostarczyć wiarygodnego rozwiązania (iteracje mogą nie osiągnąć zbieżności itp.);

— efektu stymulacji wzrostu nie można w zadowalający sposób przetworzyć za pomocą dostępnych programów komputerowych (zob. poniżej).

Procedury statystyczne

54. Celem jest uzyskanie ilościowej zależności stężenie-odpowiedź za pomocą analizy regresji. Możliwe jest zastosowanie ważonej regresji liniowej po przeprowadzeniu transformacji linearyzującej danych odpowiedzi – na przykład do jednostek probit, logit albo Weibulla (8), lecz preferowane są procedury regresji nieliniowej, które lepiej sprawdzają się w przypadku nieuniknionych nieregularności danych i odchyleń od gładkich rozkładów. Przy zbliżaniu się do zerowego albo całkowitego zahamowania nieregularności takie mogą zostać powiększone przez transformację, zakłócając analizę (8). Należy zwrócić uwagę, że standardowe metody analizy przy użyciu transformat probit, logit albo Weibulla są przeznaczone do stosowania do danych binarnych (np. dotyczących śmiertelności lub przeżywalności) i muszą zostać zmodyfikowane, aby uwzględnić dane dotyczące wzrostu lub biomasy. Szczegółowe procedury wyznaczania wartości EC_x na podstawie danych ciągłych można znaleźć w (9), (10) i (11). Zastosowanie analizy regresji nieliniowej jest opisane szczegółowo w dodatku 5.

55. Dla każdej zmiennej zależnej, która ma być analizowana, należy zastosować zależność stężenie-odpowiedź do obliczenia oszacowań punktowych wartości EC_x. W miarę możliwości dla każdego oszacowania należy określić granice ufności na poziomie 95 %. Zgodność danych odpowiedzi z modelem regresji należy ocenić graficznie lub statystycznie. Analizę regresji należy przeprowadzić z zastosowaniem odpowiedzi z poszczególnych kontrprób, a nie średnich z grup badanych. Jeśli jednak dopasowanie krzywej nieliniowej jest trudne lub nie udaje się z powodu zbyt dużego rozrzutu danych, problem ten można ominąć, wykonując regresję na średnich z grup, co jest

▼M6

praktycznym sposobem na ograniczenie wpływu podejrzewanych wartości oddalonych. Wybór tej opcji należy zaznaczyć w sprawozdaniu z badania jako odstępstwo od normalnej procedury wynikłe stąd, że dopasowania krzywej za pomocą indywidualnych kontrprób nie przyniosły zadowalającego rezultatu.

56. Oszacowania wartości EC_{50} i granice ufności można również otrzymać przy użyciu interpolacji liniowej z zastosowaniem metody bootstrap (13), jeżeli dostępne modele/metody regresji są nieodpowiednie do danych.

57. W celu oszacowania LOEC, a następnie NOEC, w odniesieniu do wpływu badanej substancji chemicznej na intensywność wzrostu, konieczne jest porównanie średnich z grup badanych przy użyciu technik analizy wariancji (ANOVA). Średnią dla każdego stężenia należy następnie porównać ze średnią kontrolną przy użyciu odpowiedniej metody wielokrotnego porównania lub testu trendu. Przydatny może być test Dunnetta lub test Williamsa (12)(14)(15)(16)(17). Należy ocenić, czy przyjęte w ANOVA założenie jednorodności wariancji nadal obowiązuje. Ocenę tę można przeprowadzić graficznie albo za pomocą formalnego testu (17). Odpowiednimi do tego celu testami są testy Levene'a lub Bartletta. Niespełnienie założenia o jednorodności wariancji można niekiedy skorygować za pomocą transformacji logarytmicznej danych. Jeżeli niejednorodność wariancji jest ekstremalna i nie można jej skorygować przez transformację, należy rozważyć analizę za pomocą takich metod jak regresyjne testy Jonckheere'a. Dodatkowe wskazówki dotyczące wyznaczania NOEC można znaleźć w (11).

58. W wyniku najnowszych osiągnięć naukowych zaleca się odstąpienie od stosowania pojęcia NOEC i zastąpienie go opartymi o regresję oszacowaniami punktowymi wartości EC_x. Dla opisywanego badania glonów nie ustalono odpowiedniej wartości x. Wydaje się, że odpowiedni jest przedział 10–20 % (w zależności od wybranej zmiennej zależnej), a najlepiej należy podać zarówno EC_{10}, jak i EC_{20}.

Stymulacja wzrostu

59. Przy niskich stężeniach obserwuje się niekiedy stymulację wzrostu (zahamowanie ujemne). Może to wynikać z hormezy („toksycznej stymulacji") albo z dodania stymulujących czynników wzrostu z materiałem badanym do użytej minimalnej pożywki. Należy zwrócić uwagę, że dodanie nieorganicznych składników odżywczych nie powinno mieć bezpośrednich skutków, ponieważ pożywka powinna zachować nadmiar składników odżywczych w ciągu całego badania. Stymulację niskodawkową można zwykle pominąć w obliczeniach EC_{50}, chyba że jest skrajna. Jeżeli jednak jest ona skrajna albo jeżeli ma być obliczona wartość EC_x dla małego x, wówczas mogą być wymagane specjalne procedury. Należy w miarę możliwości unikać usuwania reakcji stymulujących z analizy danych i jeżeli dostępne oprogramowanie do dopasowywania krzywych nie może zaakceptować drobnej stymulacji, wówczas można posłużyć się interpolacją liniową z metodą bootstrap. Jeżeli stymulacja jest skrajna, można rozważyć zastosowanie modelu hormezy (18).

Nietoksyczne zahamowanie wzrostu

60. Materiały badane pochłaniające światło mogą przyczyniać się do ograniczenia tempa wzrostu, ponieważ zacienienie zmniejsza ilość dostępnego światła. Takie fizyczne typy skutków należy oddzielić od skutków toksycznych przez zmodyfikowanie warunków badania, a te pierwsze skutki podać osobno w sprawozdaniu. Wskazówki można znaleźć w (2) i (3).

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

61. Sprawozdanie z badania musi zawierać poniższe informacje.

▼**M6**

Badana substancja chemiczna:

— właściwości fizyczne i, w stosownych przypadkach, właściwości fizykochemiczne, w tym graniczna rozpuszczalność w wodzie;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej (np. numer CAS), w tym czystość (zanieczyszczenia).

Badany gatunek:

— szczep, dostawca lub źródło oraz zastosowane warunki kultury.

Warunki badania:

— data rozpoczęcia badania i czas jego trwania;

— opis projektu badania: naczynia badawcze, objętości kultur, zagęszczenie biomasy na początku badania;

— skład pożywki;

— badane stężenia i kontrpróby (np. liczba kontrprób, liczba badanych stężeń oraz zastosowany ciąg geometryczny);

— opis sporządzania roztworów do badań, w tym użycia rozpuszczalników itp.

— urządzenie do hodowli kultur;

— natężenie i jakość światła (źródło, jednorodność);

— temperatura;

— badane stężenia: badane stężenia nominalne oraz wszelkie wyniki analiz ustalających stężenia badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych. Należy odnotować sprawność metody oraz granicę oznaczalności w zestawie badań;

— wszelkie odstępstwa od niniejszej metody badawczej;

— metoda określania biomasy oraz dowody korelacji pomiędzy mierzonym parametrem a suchą masą.

Wyniki:

— wartości pH na początku i na końcu badania w przypadku wszystkich zabiegów;

— biomasa dla każdej kolby w każdym punkcie pomiarowym oraz metoda pomiaru biomasy;

— krzywe wzrostu (wykres zależności biomasy od czasu);

— obliczone zmienne zależne dla każdej kontrpróby poddanej zabiegowi wraz z wartościami średnimi i współczynnikiem zmienności dla kontrprób;

— graficzne przedstawienie zależności stężenie/skutek;

▼M6

— oszacowania toksyczności dla zmiennych zależnych, np. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} oraz związane z nimi przedziały ufności. LOEC i NOEC, jeżeli zostały obliczone, oraz metody statystyczne użyte do ich wyznaczenia;

— jeżeli zastosowano ANOVA – wielkość wpływu, który można wykryć (np. najmniejsza znacząca różnica);

— wszelka stymulacja wzrostu stwierdzona w którymkolwiek zabiegu;

— wszelkie inne zaobserwowane skutki, np. morfologiczne zmiany glonów;

— omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

(1) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (1993). ISO 8692: Water quality – Algal growth inhibition test.

(2) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (1998). ISO/DIS 14442. IWater quality – Guidance 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. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa. Seria dotycząca badań i oceny, nr 23. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż.

(4) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (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: 2 525–2 531.

(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*. TER SOP (grudzień 2008),/HT>: 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. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż.

▼**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, wydanie 2. Wiley, Nowy Jork.

(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

Dodatek 1

Definicje

Do celów niniejszej metody badawczej użyto następujących definicji i skrótów.

Biomasa jest to sucha masa materii żywej obecnej w populacji, przypadająca na objętość, np. mg glonów/litr roztworu do badań. Zwykle „biomasę" określa się w postaci masy, lecz w niniejszym badaniu słowo to użyte jest w odniesieniu do masy przypadającej na objętość. Ponadto w niniejszym badaniu zwykle mierzy się również surogaty biomasy, takie jak liczba komórek, fluorescencja itp., w związku z czym określenie „biomasa" odnosi się także do tych pomiarów zastępczych.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Współczynnik zmienności jest bezwymiarową miarą zmienności parametru, określoną jako stosunek odchylenia standardowego do średniej. Może on być również wyrażony jako wartość procentowa. Średni współczynnik zmienności średniej właściwej szybkości wzrostu w kulturach kontrolnych kontrprób należy obliczyć w następujący sposób:

1. obliczyć procentowy współczynnik zmienności średniej właściwej szybkości wzrostu z szybkości wzrostu dla poszczególnych dni/odcinków dla odnośnej kontrpróby;

2. obliczyć wartość średnią ze wszystkich wartości obliczonych w punkcie 1, aby otrzymać średni współczynnik zmienności właściwej szybkości wzrostu dla poszczególnych dni/odcinków w kontrpróbach kultur kontrolnych.

EC_x jest stężeniem badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w pożywce, powodującym zmniejszenie wzrostu organizmu użytego do badania o x % (np. 50 %) w danym okresie narażenia (który należy wyraźnie określić, jeśli odbiega od pełnego lub normalnego czasu trwania badania). Aby jednoznacznie oznaczyć wartość stężenia efektywnego (EC) wynikającą z szybkości wzrostu albo przyrostu, w odniesieniu do szybkości wzrostu używa się symbolu „E_rC", a w odniesieniu do przyrostu – symbolu „E_yC".

Pożywka jest to kompletne syntetyczne podłoże, na którym glony wzrastają, gdy są narażone na działanie badanej substancji chemicznej. Badana substancja chemiczna jest zwykle rozpuszczona w pożywce.

Szybkość wzrostu (średnia właściwa szybkość wzrostu) jest to logarytmiczny przyrost biomasy w okresie narażenia.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC) jest to najniższe badane stężenie, przy którym obserwuje się, że substancja chemiczna ma statystycznie istotny wpływ na ograniczenie wzrostu (przy $p < 0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną w danym czasie narażenia. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC muszą mieć szkodliwy skutek równy lub większy niż te, które są obserwowane przy LOEC. W przypadku gdy te dwa warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC).

Stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) jest to badane stężenie bezpośrednio poniżej LOEC.

Zmienna zależna jest to zmienna służąca do szacowania toksyczności, uzyskana z dowolnych zmierzonych parametrów opisujących biomasę za pomocą różnych metod obliczania. W przypadku niniejszej metody badawczej zmiennymi zależnymi są szybkość wzrostu i przyrost, które otrzymuje się bezpośrednio z pomiaru biomasy albo z pomiaru dowolnego ze wspomnianych surogatów.

▼**M6**

Właściwa szybkość wzrostu jest to zmienna zależna określona jako iloraz różnicy logarytmów naturalnych parametru obserwacji (w niniejszej metodzie badawczej – biomasy) i odnośnego okresu.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Przyrost jest to wartość zmiennej pomiarowej na końcu okresu narażenia minus wartość zmiennej pomiarowej na początku okresu narażenia, wyrażająca przyrost biomasy w trakcie badania.

▼M6

Dodatek 2

Szczepy nadające się do wykorzystania w badaniu

Zielenice

Pseudokirchneriella subcapitata (znana wcześniej jako *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (znana wcześniej jako *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Okrzemki

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cyjanobakterie

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Źródła szczepów

Zalecane szczepy dostępne są w kulturach pojedynczych glonów z następujących zbiorów (w kolejności alfabetycznej):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
STANY ZJEDNOCZONE

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Ambleside
Cumbria LA22 0LP
ZJEDNOCZONE KRÓLESTWO

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
NIEMCY

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
STANY ZJEDNOCZONE.

▼M6

Wygląd i cechy charakterystyczne zalecanych gatunków

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Wygląd	Zakrzywione, skręcone pojedyncze komórki	Owalne, głównie pojedyncze komórki	Pałeczki	Łańcuchy owalnych komórek	Pałeczki
Rozmiar (dł. × szer.) µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Objętość komórek (μm^3/komórka)	40–601 (1)	60–801 (1)	40–501 (1)	30–401 (1)	2,5 (2)
Sucha masa komórek (mg/komórka)	$2–3 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$1\text{-}2 \times 10^{-8}$	$2–3 \times 10^{-9}$
Szybkość wzrostu (3) (dzień$^{-1}$)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

(1) Zmierzone za pomocą elektronicznego licznika cząstek.
(2) Obliczone na podstawie rozmiaru.
(3) Najczęściej obserwowana szybkość wzrostu w pożywce OECD przy natężeniu światła wynoszącym około 70 µE m^{-2} s^{-1} i 21 °C.

Specjalne zalecenia dotyczące hodowli i prowadzenia kultur gatunków zalecanych do użycia w badaniach

Pseudokirchneriella subcapitata i Desmodesmus subspicatus

Zielenice te są zasadniczo łatwe do utrzymania na różnych pożywkach hodowlanych. Informacje dotyczące odpowiednich pożywek są dostępne w placówkach posiadających zbiory kultur. Komórki występują zazwyczaj pojedynczo, a pomiary zagęszczenia komórek można z łatwością wykonać za pomocą elektronicznego licznika cząstek lub mikroskopu.

Anabaena flos-aquae

W celu utrzymania kultury wyjściowej stosować można różne pożywki. Szczególnie istotne jest, aby w hodowlach okresowych nie dopuścić do przekroczenia fazy logarytmicznego wzrostu podczas odnawiania, ponieważ odzysk w tym momencie jest utrudniony.

Anabaena flos-aquae tworzy agregaty upakowanych łańcuchów komórek. Wielkość tych agregatów różni się w zależności od warunków hodowli. W przypadku liczenia komórek pod mikroskopem może zachodzić konieczność rozbicia tych skupisk; ewentualnie do obliczenia biomasy używa się elektronicznego licznika cząstek.

Aby ograniczyć zmienność wyników obliczeń, można rozbijać podpróbki metodą sonikacji. Sonikacja trwająca dłużej niż wymaga tego rozbicie łańcuchów na krótsze odcinki może spowodować zniszczenie komórek. W przypadku każdego zabiegu natężenie i czas trwania sonikacji muszą być identyczne.

Aby łatwiej było skompensować zmienność wyników liczenia, należy policzyć na hemocytometrze dostateczną liczbę pól (co najmniej 400 komórek). Pozwoli to zwiększyć wiarygodność mikroskopowych oznaczeń gęstości.

Po uprzednim rozbiciu łańcuchów komórek metodą sonifikacji z zachowaniem ostrożności, do wyznaczenia całkowitej objętości komórek Anabaena można użyć elektronicznego licznika cząstek. Energia procesu sonifikacji musi zostać wyregulowana, aby nie doprowadzić do rozerwania komórek.

Użyć wstrząsarki lub podobnej odpowiedniej metody w celu zapewnienia dobrego wymieszania i jednorodności zawiesiny glonów użytej do zaszczepiania naczyń badawczych.

▼**M6**

Naczynia badawcze należy umieścić na blacie wstrząsarki o ruchu obrotowym lub posuwisto-zwrotnym, nastawionej na około 150 obrotów na minutę. Innym rozwiązaniem jest zastosowanie wstrząsania przerywanego, aby zmniejszyć tendencję bakterii Anabaena do zbijania się w skupiska. W przypadku tworzenia się skupisk należy dołożyć starań, aby uzyskać próbki reprezentatywne dla pomiarów biomasy. Przed pobraniem próbek może zajść potrzeba energicznego wstrząsania w celu rozbicia skupisk glonów.

Synechococcus leopoliensis

W celu utrzymania hodowli kultury wyjściowej stosować można różne pożywki. Informacje dotyczące odpowiednich pożywek są dostępne w placówkach posiadających zbiory kultur.

Synechococcus leopoliensis rozwija się w postaci odosobnionych komórek mających kształt laseczek. Komórki są bardzo małe, przez co liczenie mikroskopowe na potrzeby pomiarów biomasy jest skomplikowane. Przydatne są elektroniczne liczniki cząstek przystosowane do liczenia cząstek o minimalnych rozmiarach wynoszących około 1 μm. Można zastosować również pomiary fluorometryczne in vitro.

Navicula pelliculosa

W celu utrzymania hodowli kultury wyjściowej stosować można różne pożywki. Informacje dotyczące odpowiednich pożywek są dostępne w placówkach posiadających zbiory kultur. Należy zwrócić uwagę, że pożywka musi zawierać krzemian.

W pewnych warunkach wzrostu Navicula pelliculosa może tworzyć skupiska. Z uwagi na wytwarzanie lipidów komórki glonów wykazują niekiedy tendencję do gromadzenia się w warstwie powierzchniowej. Aby w takich okolicznościach uzyskać próbki reprezentatywne, należy zastosować szczególne środki podczas pobierania podpróbek do określania biomasy. Konieczne może być energiczne mieszanie, np. z użyciem wstrząsarki.

▼**M6**

Dodatek 3

Pożywki

Można stosować jedną z dwóch wymienionych poniżej pożywek:

— pożywkę OECD: pierwotna pożywka według dotyczącej badań wytycznej OECD nr 201, zgodna również z normą ISO 8692;

— pożywka AAP (US EPA), zgodna również z ASTM.

Do przygotowania tych pożywek należy użyć odczynników lub substancji chemicznych do analiz oraz wody dejonizowanej.

Skład pożywki AAP (US EPA) i pożywki OECD TG 201

Składnik	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
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Stosunek molowy EDTA do żelaza nieznacznie przekracza jeden. Zapobiega to strącaniu się żelaza, a jednocześnie zminimalizowane jest chelatowanie jonów metali ciężkich.

W badaniu z użyciem okrzemka *Navicula pelliculosa* obydwie pożywki należy uzupełnić $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$, aby uzyskać stężenie 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

Wartość pH pożywki uzyskuje się przy zachowaniu równowagi pomiędzy układem węglanowym pożywki a ciśnieniem cząstkowym CO_2 w powietrzu atmosferycznym. Przybliżona zależność pomiędzy pH w temp. 25 °C a stężeniem molowym dwuwęglanu jest następująca:

$pH_{eq} = 11.30 + \log[HCO_3]$

Przy 15 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 7,5 (pożywka U.S. EPA), a przy 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (pożywka OECD).

Skład pierwiastkowy pożywek przeznaczonych do badań

Pierwiastek	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

Przygotowanie pożywki OECD

Składnik odżywczy	Stężenie w roztworze podstawowym
Roztwór podstawowy 1: makroskładniki odżywcze	
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
Roztwór podstawowy 2: żelazo	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Roztwór podstawowy 3: pierwiastki śladowe	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Składnik odżywczy	Stężenie w roztworze podstawowym
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Roztwór podstawowy 4: wodorowęglan	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Roztwory podstawowe poddać sterylizacji na filtrze membranowym (średnia średnica porów 0,2 μm) lub w autoklawie (120 °C, 15 minut). Roztwory przechowywać bez dostępu światła w temperaturze 4 °C.

Roztworów podstawowych 2 i 4 nie poddawać sterylizacji w autoklawie, tylko na filtrze membranowym.

Przygotować pożywkę, dodając do wody roztwory podstawowe 1–4 w odpowiedniej objętości:

do 500 ml wysterylizowanej wody dodać:

10 ml roztworu podstawowego 1;

1 ml roztworu podstawowego 2;

1 ml roztworu podstawowego 3;

1 ml roztworu podstawowego 4;

Uzupełnić wysterylizowaną wodą do 1 000 ml.

Zapewnić wystarczająco dużo czasu na osiągnięcie równowago między pożywką i CO_2, w razie potrzeby stosując przez kilka godzin barbotaż sterylnym, przefiltrowanym powietrzem.

Przygotowanie pożywki U.S. EPA

1. Dodać 1 ml każdego roztworu podstawowego wymienionego w pkt 2.1–2.7 do około 900 ml wody dejonizowanej lub destylowanej, a następnie uzupełnić do 1 l.

2. Roztwory podstawowe makroskładników odżywczych sporządza się, rozpuszczając poniższe substancje w 500 ml wody dejonizowanej lub destylowanej. Odczynniki w pkt 2.1, 2.2, 2.3 oraz 2.4 można połączyć w jeden roztwór podstawowy.

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	Roztwór podstawowy mikroskładnika odżywczego (zob. pkt 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	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	Zob. uwaga 1.

▼**M6**

Uwaga 1: Stosować wyłącznie w odniesieniu do gatunków okrzemków używanych do badania. Można dodać bezpośrednio (202,4 mg) lub za pośrednictwem roztworu podstawowego, aby otrzymać w pożywce stężenie końcowe Si wynoszące 20 mg/l.

3. Roztwór podstawowy mikroskładników odżywczych sporządza się, rozpuszczając poniższe substancje w 500 ml wody dejonizowanej lub destylowanej:

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	[sól dwusodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego];
3.9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg	Zob. uwaga 2.

Uwaga 2: Stosować tylko w pożywce dla kultur wyjściowych gatunków okrzemków.

4. Wyregulować pH do 7,5 ± 0,1 za pomocą 0,1 *N* lub 1,0 *N* NaOH lub HCl.

5. Przefiltrować pożywkę do sterylnego pojemnika przez filtr membranowy 0,22 mm, jeżeli ma być użyty licznik cząstek, a w przeciwnym wypadku – filtr 0,45 mm.

6. Do czasu użycia pożywkę należy przechowywać bez dostępu światła w temperaturze około 4 °C.

▼M6

Dodatek 4

Przykład procedury hodowli glonów

Obserwacje ogólne

Celem hodowli na podstawie niniejszej procedury jest uzyskanie hodowli glonów do badań toksyczności.

Należy zastosować odpowiednie metody, aby nie dopuścić do zainfekowania hodowli glonów bakteriami. Pożądane mogą być kultury akseniczne, jednak należy utworzyć i używać monogatunkowej hodowli glonów.

Wszystkie czynności muszą być wykonywane w warunkach sterylnych, aby zapobiec zanieczyszczeniu bakteriami i innymi glonami.

Sprzęt i materiały

Zob. metoda badawcza: Aparatura.

Procedury otrzymywania kultur glonów

Przygotowanie roztworów składników odżywczych (pożywki):

Wszystkie sole odżywcze pożywki przygotowuje się w postaci stężonych roztworów podstawowych i przechowuje się w chłodnym miejscu bez dostępu światła. Roztwory te sterylizuje się, filtrując je lub sterylizując w autoklawie.

Pożywkę sporządza się, dodając odpowiednią ilość roztworu podstawowego do sterylnej wody destylowanej i uważając, aby nie doszło do zakażenia. Do odżywki w postaci stałej dodaje się 0,8 % agaru.

Kultura wyjściowa:

Kultury wyjściowe są to nieduże hodowle glonów, które przenosi się regularnie na świeże podłoże, tak aby pełniły rolę początkowego materiału do badań. Jeżeli hodowle nie są regularnie zużywane, rozprzestrzeniają się, tworząc pasma na ukośnych powierzchniach agaru w próbówce. Pasma przenosi się na świeże podłoże co najmniej raz na dwa miesiące.

Kultury wyjściowe hoduje się w kolbach stożkowych zawierających odpowiednią pożywkę (pojemność około 100 ml). Gdy glony inkubuje się w 20 °C przy stałym oświetleniu, przy czym wymagane jest cotygodniowe ich przenoszenie.

Podczas przenoszenia pewna ilość starej hodowli jest przenoszona za pomocą sterylnych pipet do kolby ze świeżą pożywką, tak aby początkowe stężenie gatunków charakteryzujących się szybkim wzrostem było około 100 razy mniejsze niż w starej hodowli.

Szybkość wzrostu gatunku można wyznaczyć za pomocą krzywej wzrostu. Jeżeli jest ona znana, możliwe jest oszacowanie zagęszczenia, przy którym hodowlę należy przenieść do nowej pożywki. Należy to zrobić, zanim hodowla osiągnie fazę zamierania.

Hodowla wstępna:

Celem hodowli wstępnej jest wytworzenie odpowiedniej ilości glonów nadającej się do inokulacji badanych hodowli. Hodowlę wstępną inkubuje się w warunkach badania i wykorzystuje podczas fazy wzrostu wykładniczego, zwykle po okresie inkubacji wynoszącym 2–4 dni. Hodowle glonów należy odrzucić, w przypadku gdy występują w nich komórki zdeformowane lub anormalne.

▼M6

Dodatek 5

Analiza danych za pomocą regresji nieliniowej

Założenia ogólne

Odpowiedź w badaniach glonów i badaniach wzrostu innych mikroorganizmów, czyli wzrost biomasy, ma z natury rzeczy charakter zmiennej ciągłej lub metrycznej – intensywność procesu, jeżeli zastosowano szybkość wzrostu oraz jego całkę po czasie, jeżeli wybrana została biomasa. Obydwie zmienne odniesione są do odpowiedniej średniej odpowiedzi nienarażonych kontrpróbek kontrolnych, wykazujących maksymalną odpowiedź w odniesieniu do narzuconych warunków, przy czym światło i temperatura stanowią podstawowe decydujące czynniki w badaniu z użyciem glonów. Układ jest rozłożony lub jednorodny, a biomasę można postrzegać jako kontinuum bez uwzględniania poszczególnych komórek. Rozkład wariancji typu odpowiedzi w takim układzie wiąże się wyłącznie z czynnikami doświadczalnymi (zwykle opisywanymi przez logarytmiczno-normalne lub normalne rozkłady błędu). Stanowi to przeciwieństwo typowych odpowiedzi pomiaru aktywności biologicznej z danymi binarnymi, w przypadku których często przyjmuje się, że dominującą składową wariancji jest tolerancja poszczególnych organizmów (zazwyczaj o rozkładzie dwumianowym). Odpowiedzi próby kontrolnej są tu na poziomie zerowym lub tła.

Jeżeli sytuacja nie jest skomplikowana, znormalizowana lub względna reakcja „r” maleje monotonicznie od 1 (zahamowanie zerowe) do 0 (zahamowanie 100-procentowe). Należy zwrócić uwagę, że ze wszystkimi reakcjami związany jest błąd i że pozorne ujemne zahamowania można obliczyć jedynie jako wynik błędu przypadkowego.

Analiza regresji

Modele

Celem analizy regresji jest ilościowe opisanie krzywej zależności stężenie-odpowiedź w postaci matematycznej funkcji regresji $Y = f(C)$, lub częściej $F(Z)$, gdzie $Z = \log C$. Zastosowana jako odwrotność $C = f^{-1}(Y)$ pozwala obliczyć wielkości EC_x, w tym EC_{50}, EC_{10} i EC_{20} oraz ich 95 % granic ufności. Wykazano, że kilka prostych matematycznych postaci funkcji z powodzeniem opisuje zależności stężenie-odpowiedź uzyskiwane w badaniach nad zahamowaniem rozwoju glonów. Do funkcji tych należy na przykład równanie logistyczne, niesymetryczne równanie Weibulla oraz funkcja rozkładu logarytmiczno-normalnego, przy czym wszystkie one są krzywymi sigmoidalnymi dążącymi asymptotycznie do zera dla $C \rightarrow 0$ oraz do jedności dla $C \rightarrow$ nieskończoności.

Zaproponowano ostatnio zastosowanie modeli opartych na ciągłych funkcjach progowych (np. modelu Kooijmana „dla zahamowania wzrostu populacji”, Kooijman i in., 1996), które może też stanowić alternatywne rozwiązanie w stosunku do modeli asymptotycznych. Model ten zakłada brak efektów przy stężeniach poniżej pewnego progu, EC_0+, który szacuje się, ekstrapolując zależności stężenie-odpowiedź w celu wyznaczenia punktu przecięcia z osią stężeń przy użyciu prostej funkcji ciągłej, która nie jest różniczkowalna w punkcie początkowym.

Należy zwrócić uwagę, że analiza ta może być prostą minimalizacją resztowych sum kwadratów odchyleń (przy założeniu stałej wariancji) albo ważonych kwadratów, jeżeli kompensowana jest heterogeniczność wariancji.

Procedura

Procedurę można opisać pokrótce w następujący sposób: wybrać odpowiednie równanie funkcyjne $Y = f(C)$ i dopasować je do danych za pomocą regresji nieliniowej. Aby uzyskać jak najwięcej informacji na podstawie danych, zamiast średnich wartości kontrprób najlepiej jest wykorzystać wyniki pomiarów wykonanych w każdej kolbie oddzielnie. Jeżeli natomiast wariancja jest wysoka, to

▼M6

zgodnie z praktycznym doświadczeniem średnie wartości kontrprób mogą zapewnić dokładniejszą estymację matematyczną, w mniejszym stopniu obciążoną błędami systematycznymi danych, niż to ma miejsce w przypadku zachowania każdego poszczególnego punktu danych.

Należy wykreślić dopasowaną krzywą i nanieść zmierzone dane oraz zbadać, czy dopasowanie krzywej jest odpowiednie. Narzędziem szczególnie przydatnym w tym celu może być analiza reszt. Jeżeli zależność funkcyjna wybrana w celu dopasowania zależności stężenie-odpowiedź nie opisuje dobrze całej krzywej lub istotnej jej części, takiej jak odpowiedź przy niskich stężeniach, to należy wybrać inną możliwość dopasowania krzywej – np. krzywą niesymetryczną, taką jak funkcja Weibulla, zamiast symetrycznej. Ujemne zahamowania mogą stwarzać na przykład problemy w przypadku funkcji rozkładu logarytmiczno-normalnego i również wymagać zastosowania alternatywnej funkcji regresji. Nie zaleca się przypisywania takim ujemnym wartościom zerowej lub małej dodatniej wartości, ponieważ powoduje to zniekształcenie rozkładu błędów. Aby oszacować wielkości EC_{lowx} odpowiednie może być wykonanie oddzielnych dopasowań krzywej na częściach krzywej, takich jak część o małym zahamowaniu. Obliczyć z dopasowanego równania (za pomocą „oszacowania odwrotnego” $C = f^{-1} (Y)$) charakterystyczne oszacowania punktowe EC_x i podać oszacowanie EC_{50} jako minimum oraz jedno lub dwa oszacowania
$EC_{low\ x}$. Doświadczenie wynikające z badań praktycznych wskazuje, że precyzja badania glonów zwykle umożliwia dość dokładne oszacowanie na poziomie zahamowania równym 10 %, jeżeli istnieje dostateczna liczba punktów danych, o ile przy niskich stężeniach nie występuje stymulacja, stanowiąca czynnik zakłócający. Dokładność oszacowania EC_{20} jest często znacznie większa niż EC_{10}, ponieważ EC_{20} zazwyczaj znajduje się w środkowej części krzywej zależności stężenie-odpowiedź, która jest w przybliżeniu liniowa. Niekiedy EC_{10} może być trudne w interpretacji z powodu stymulacji wzrostu. Tak więc, chociaż EC_{10} zwykle da się uzyskać z dostateczną dokładnością, zaleca się, aby w sprawozdaniu zawsze podawać również EC_{20}.

Współczynniki ważenia

Wariancja doświadczalna na ogół nie jest stała i zwykle zawiera składową proporcjonalną, a zatem korzystne jest rutynowe zastosowanie metody ważonej regresji. Do takiej analizy przyjmuje się zazwyczaj współczynniki ważenia odwrotnie proporcjonalne do wariancji:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Wiele programów analizy regresyjnej dopuszcza opcję ważonej analizy regresji ze współczynnikami ważenia podanymi w tabeli. Dogodne jest znormalizowanie współczynników ważenia przez pomnożenie ich przez $n/\Sigma w_i$ (n jest liczbą punktów danych), tak aby ich suma równała się jedności.

Normalizowanie odpowiedzi

Normalizowanie za pomocą średniej odpowiedzi próby kontrolnej stwarza pewne zasadnicze problemy i prowadzi do dość skomplikowanej struktury wariancji. Dzieląc odpowiedzi przez średnią odpowiedź próby kontrolnej w celu uzyskania procentowego poziomu zahamowania, wprowadza się dodatkowy błąd spowodowany błędem średniej kontrolnej. Współczynniki ważenia w regresji i granice ufności należy skorygować pod względem kowariancji za pomocą próby kontrolnej (Draper i Smith, 1981), chyba że błąd ten jest bardzo mały. Należy zwrócić uwagę, że wysoka dokładność oszacowanej średniej odpowiedzi próby kontrolnej jest ważna dla zminimalizowania ogólnej wariancji dla względnej odpowiedzi. Wariancja ta jest następująca:

(Indeks dolny „i” odnosi się do poziomu stężenia „i”, a indeks dolny 0 do prób kontrolnych)

$$Yi = \text{Odpowiedź względna} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼**M6**

przy wariancji $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial Yi/\partial r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

a ponieważ $(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0$ oraz $(\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$

mając dane o rozkładzie normalnym oraz m_i i m_0 kontrprób: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

całkowita wariancja względnej odpowiedzi, Y_i, staje się zatem:

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

Błąd średniej próby kontrolnej jest odwrotnie proporcjonalny do pierwiastka kwadratowego z liczby uśrednionych kontrprób prób kontrolnych i niekiedy uzasadnione może być uwzględnienie danych historycznych i w ten sposób znaczne zmniejszenie błędu. Alternatywna procedura nie polega na normalizowaniu danych i dopasowaniu bezwzględnych odpowiedzi, w tym danych z odpowiedzi prób kontrolnych, lecz na wprowadzeniu, jako dodatkowego parametru, wartości odpowiedzi kontrolnej, która będzie dopasowana za pomocą regresji nieliniowej. W przypadku używanego zwykle dwuparametrowego równania regresji metoda ta wymaga dopasowania trzech parametrów – a tym samym większej liczby punktów danych niż nieliniowa regresja danych – które są normalizowane za pomocą zadanej odpowiedzi próby kontrolnej.

Odwrotne przedziały ufności

Obliczanie przedziałów ufności regresji nieliniowej za pomocą oszacowania odwrotnego jest dość złożone i nie jest dostępne jako opcja standardowa w zwykłych pakietach statystycznych programów komputerowych. Przybliżone granice ufności można otrzymać za pomocą standardowych programów regresji nieliniowej z reparametryzacją (Bruce i Versteeg, 1992), co polega na przepisaniu równania matematycznego z żądanymi oszacowaniami punktowymi, np. EC_{10} i EC_{50}, jako parametrami, które mają być oszacowane. (Weźmy funkcję $I = f(\alpha, \beta,$ stężenie) i wykorzystajmy definicyjne zależności $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0{,}1$ i $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0{,}5$, aby w miejsce f α, β, stężenie) podstawić równoważną funkcję g (EC_{10}, EC_{50}, stężenie)).

Bardziej bezpośrednie obliczenie (Andersen i in. 1998) przeprowadza się, zachowując pierwotne równanie i stosując rozwinięcie w szereg Taylora wokół średnich r_i i r_0.

Ostatnio popularne stały się metody „bootstrap”. Metody takie wykorzystują dane zmierzone oraz wielokrotne losowanie ze zwracaniem przeprowadzone za pomocą generatora liczb losowych do szacowania empirycznego rozkładu wariancji.

BIBLIOGRAFIA

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, wydanie 2. Wiley, Nowy Jork.

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. OZNACZENIE BIODEGRADOWALNOŚCI

CZĘŚĆ I. ROZWAŻANIA OGÓLNE

I.1. WPROWADZENIE

Opisano sześć metod pozwalających na sortowanie substancji chemicznych w celu biodegradowalności w aerobowych wodnych podłożach:

a) rozpuszczalny węgiel organiczny (DOC) metoda „Die-Away" (metoda C.4-A);

b) zmodyfikowane badanie przesiewowe OECD – DOC metoda „Die-Away" (metoda C.4-B);

c) wydzielanie ditlenku węgla (CO_2) (Zmodyfikowane badanie Sturma) (metoda C.4-C);

d) respirometria manometryczna (metoda C.4-D);

e) zamkniętej butli (metoda C.4-E);

f) MITI (Ministerstwo Handlu Międzynarodowego i Przemysłu – Japonia) (Metoda C.4-F).

Zwykłe i ogólne rozważania do wszystkich sześciu badań podano w części I metody. Punkty specyficzne dla poszczególnych metod podano w częściach II–VII. Dodatki zawierają definicje, wzory i materiał wiodący.

Ćwiczenie porównawcze międzynarodowego laboratorium OECD, przeprowadzone w 1988 r., pokazały ze metody dają zgodne wyniki. Jednakże w zależności od fizycznych charakterystyk badanych substancji jedna lub inne metody są zalecane.

I.2. WYBÓR ODPOWIEDNIEJ METODY

W celu wybrania najbardziej odpowiedniej metody podstawowe jest posiadanie informacji na temat rozpuszczalności chemicznej, prężności pary i charakterystyk adsorpcji. Powinna być znana struktura chemiczna i wzór w celu obliczenia teoretycznych wartości i/lub sprawdzenia wartości pomierzonych parametrów, na przykład ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD (zob. załącznik I i II).

Badania substancji chemicznych rozpuszczalnych w wodzie w co najmniej 100 mg/l mogą być oszacowane wszystkimi metodami, pod warunkiem że są one nielotne i nieabsorbujące. Dla tych substancji chemicznych, które są słabo rozpuszczalne w wodzie, lotne lub adsorbujące, odpowiednie metody wskazano w tabeli 1. Sposób w który substancje chemiczne słabo rozpuszczalne w wodzie można przygotować opisano w załączniku III. Średnio lotne substancje chemiczne mogą być badane metodą DOC (metoda „Die-Away"), jeżeli jest wystarczająca przestrzeń na gaz w naczyniach pomiarowych (które powinny być odpowiednio zakorkowane). W tym przypadku należy ustawić kontrolę abiotyczną, by nie pozwolić na jakiekolwiek straty fizyczne.

▼B

Tabela 1

Stosowalność metod badania

Badanie	Metoda analityczna	Odpowiedniość dla substancji, które są:		
		Słabo rozpuszczalne	lotne	adsorbujące
DOC Die-Away	Rozpuszczalny węgiel organiczny	—	—	+/-
Zmod. OECD Die-Away	Rozpuszczalny węgiel organiczny	—	—	+/-
Wydzielanie CO_2	Respirometria: wydzielanie CO_2	+	—	+
Respirometria manometryczna	Respirometria manometryczna: zużycie tlenu	+	+/-	+
Zamkniętej butla	Respirometria: rozpuszczony tlen	+/-	+	+
MITI	Respirometria: zużycie tlenu	+	+/-	+

Wymagane są informacje na temat czystości lub względnych stosunków głównych składników badanego materiału w celu interpretacji uzyskanych wyników, szczególnie gdy wyniki są niskie lub marginalne.

Informacje na temat toksyczności badanej substancji w stosunku do bakterii (załącznik IV) są bardzo użyteczne dla wyboru odpowiednich stężeń badania i mogą być podstawowe dla prawidłowej interpretacji niskich wartości biodegradacji.

I.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

W celu sprawdzenia procedury chemiczne substancje odniesienia spełniające kryteria łatwej biodegradowalności są badane przez umieszczenie w odpowiedniej kolbie równolegle do zwykłego przebiegu badania.

Odpowiednimi substancjami chemicznymi są anilina (świeżo destylowana), octan sodu i benzoesan sodu. Te chemiczne substancje odniesienia całkowicie degradują się w tych metodach, nawet gdy nie dodano przezornie inokulum.

Zasugerowano, że należy szukać chemicznej substancji odniesienia, która by była łatwo biodegradowalna, lecz wymagałaby dodania inokulum. Zaproponowano wodoroftalan potasu lecz potrzeba uzyskać więcej dowodów dla tej substancji przed jej zaakceptowaniem jako substancji odniesienia.

W badaniach respirometrycznych, związki zawierające azot oddziaływują na pobieranie tlenu z powodu procesu nitryfikacji (zob. załączniki II i V).

I.4. ZASADA METOD BADAŃ

Roztwór lub zawiesinę substancji badanej na podłożu mineralnym jest zaszczepiany i inkubowany w warunkach aerobowych w ciemności lub rozproszonym świetle. Ilość DOC w roztworze badanym powinna być utrzymywana tak mała jak to możliwe w porównaniu z ilością DOC spodziewanej w substancji badanej. Wykonuje się poprawkę na aktywność endogeniczną inokulum przez prowadzenie równoległych badań ślepych z inokulum, ale bez substancji badanej, chociaż endogeniczna aktywność komórek w obecności substancji nie tak samo dokładnie odpowiada tej w kontroli endogenicznej. Substancja odniesienia jest równolegle badana w celu sprawdzenia operacji procedury.

▼B

Ogólnie biorąc, degradacja jest wykonywana przez oznaczanie parametrów takich jak DOC, tworzenie CO_2 i pobrany tlen, wykonywane są pomiary w dostatecznie częstych odstępach czasu pozwalających na identyfikację początku i końca biodegradacji. Przy zastosowaniu automatycznych respirometrów pomiar staje się ciągły. DOC jest czasem mierzony dodatkowo do innych parametrów, lecz jest to zwykle wykonywane tylko na początku i końcu badania. Stosuje się także specyficzną analizę chemiczną do oceny pierwotnej degradacji substancji badanej i do oznaczenia stężenia wszystkich utworzonych substancji pośrednich (obligatoryjne w badaniu MITI).

Zwykle badanie biegnie przez 28 dni. Badanie jednakże można zakończyć przed upływem 28 dni, to jest wtedy kiedy krzywa biodegradacji osiąga plateau dla co najmniej 3 oznaczeń. Badania można także wydłużyć ponad 28 dni, jeżeli krzywa pokazuje, że biodegradacja rozpoczęła się natomiast nie osiągnięto plateau 28 dnia.

I.5. KRYTERIA JAKOŚCI

I.5.1. **Odtwarzalność**

Z powodu istoty biodegradacji oraz stosowania mieszanych populacji bakteryjnych oznaczenia przeprowadzać co najmniej zdublowane.

Ze zwykłego doświadczenia wynika, iż im większe jest stężenie drobnoustrojów wstępnie dodanych do podłoża badawczego, tym mniejsze będą zmiany między replikami. Badanie obrączkowe również pokazuje, że mogą występować duże zmiany między wynikami uzyskanymi przez rożne laboratoria, lecz zwykle uzyskuje się dobrą zgodność przy zastosowaniu łatwo degradowalnych związków.

I.5.2. **Ważność badania**

Badanie uznaje się za ważne, jeżeli różnica ekstremów wartości replikowanych zdjętych z plateau badanej substancji pod koniec badania lub pod koniec badania 10-dniowego „okiennego” jest na koniec badania, odpowiednio, mniejsza od 20 %, oraz jeżeli procentowa degradacja substancji odniesienia osiągnęła poziom łatwej biodegradacji przez 14 dni. Jeżeli jeden z tych warunków nie jest spełniony badanie należy powtórzyć. Z powodu ostrości tych metod niskie wartości niekoniecznie oznaczają, że substancja badana nie jest biodegradowalna w warunkach środowiskowych, lecz wskazuje, że konieczne jest więcej wysiłków do ustalenia biodegradowalności.

Jeżeli w badaniu toksyczności, zawierającym zarówno substancję badaną, jak i chemiczną substancję odniesienia, zachodzi mniej niż 35 % degradacji (w oparciu o DOC) lub mniej niż 25 % (w oparciu o ThOD lub $ThCO_2$) w ciągu 14 dni, badaną substancję można ocenić jako inhibitor (zob. także załącznik IV). Należy powtórzyć serie badań, jeżeli możliwe jest użycie niższego stężenia badanej substancji i/lub wyższego stężenia inokulum, lecz nie większego niż 30 mg ciała stałego/litr.

I.6. PROCEDURY OGÓLNE I PRZYGOTOWANIA

Ogólne warunki stosowane w badaniach podsumowano w tabeli 2. Przyrząd oraz inne warunki eksperymentalne specyficznie właściwe dla poszczególnych badań opisano dalej, pod nagłówkami dla danego badania.

▼B

Tabela 2

Warunki badania

Badanie	DOC (metoda „Die-Away")	CO_2 wydzielanie	Respirometria manometryczna	Zmodyfikowane OECD badanie przesiewowe	Zamknięta butla	MITT (I)
Stężenie badanej substancji jako						
mg/l			100 V		2–10	100
mg DOC/l	10–40	10–20		10–40		
mg ThOD/1			50–100		5–10	
Stężenie inokulum (komórek/l, przybliżone)	≤ 30 mg/1 SS lub ≤ 100 ml wycieku/l (10^7 – 10^8)			0,5 ml wtórny wyciek/1 (10^5)	< 5 ml wycieku/1 (10^4 –10^6)	30 mg/1 SS (10^7-10^8)
Stężenie pierwiastków w podłożu mineralnym (w 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 V				0,05 - 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					korzystnie 7,0
Temperatura	22 ± 2 °C					25 ± I °C

DOC = rozpuszczony węgiel organiczny ThOD = teoretyczne zapotrzebowanie tlenu SS = zawieszone ciała stałe

I.6.1. **Woda rozcieńczająca**

Stosuje się dejonizowaną lub destylowaną wodę, wolne od inhibujących stężeń substancji toksycznych (np. jonów Cu^{++}). Musi zawierać nie więcej niż 10 % zawartości węgla organicznego wprowadzanego w badanym materiale. Konieczna jest woda do badań o wysokiej czystości w celu eliminacji wysokich wartości dla ślepej próby. Zanieczyszczenia mogą pochodzić z naturalnych zanieczyszczeń wody, ale również z żywic jonowymiennych oraz lizowanych materiałów bakteryjnych i glonów. Dla każdej serii badań stosuje się tylko jedną partię wody, sprawdzoną uprzednio analizą DOC. Takie sprawdzenie nie jest konieczne dla badania „zamkniętej butli", lecz zapotrzebowanie wody na tlen musi być niskie.

▼B

I.6.2. **Roztwory podstawowe składników mineralnych**

Do sporządzenia roztworów badanych sporządzane są roztwory podstawowe o odpowiednich stężeniach składników mineralnych. Następujące roztwory podstawowe są używane (o różnych współczynnikach rozcieńczenia) dla metod DOC „Die-Away" zmodyfikowanego badania przesiewowego OECD, wydzielanie CO_2, respirometrii manometrycznej i badania „zamkniętej butli".

Współczynniki rozcieńczenia oraz, dla badania MITI, właściwie przygotowane podłoża mineralne podano pod nagłówkami właściwych badań.

Roztwory podstawowe:

Przygotować następujące roztwory podstawowe, stosując odczynniki czystości analitycznej.

a) Diwodoroortofosforan monopotasu, KH_2PO_4 8,50 g

Monowodoroortofosforan dipotasu, K_2HPO_4 21,75 g

Diwodny monowodoroortofosforan disodium $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$ 33,40 g

Chlorek amonu, NH_4CI 0,50 g

Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra. Wartość pH roztworu powinna być 7,4.

b) Chlorek wapnia, bezwodny, $CaCl_2$ 27,50 g

lub chlorek wapnia diwodny, $CaCl_2, 2 H_2O$ 36,40 g

Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra.

c) Heptawodny siarczan magnezu, $MgSO_4 . 7 H_2O$ 22,50 g

Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra.

d) Heksawodny chlorek żelaza (III), $FeCl_3 . 6 H_2O$ 0,25 g

Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra.

Uwaga: aby nie przygotowywać niniejszego roztworu bezpośrednio przed użyciem, dodać kroplę stężonego kwasu solnego lub 0,4 grama soli disodowej kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) na litr.

I.6.3. **Roztwory podstawowe substancji chemicznych**

Przykładowo rozpuścić 1–10 g odpowiednio badanej substancji chemicznej lub chemicznej substancji odniesienia w wodzie dejonizowanej i dopełnić do 1 litra, gdy rozpuszczalność przekracza 1 g/l. Z drugiej strony, przygotować roztwory podstawowe w podłożu mineralnym lub dodać substancje chemiczną bezpośrednio do podłoża mineralnego. Postępowanie ze słabo rozpuszczalnymi substancjami chemicznymi – zob. załącznik III, ale w badaniu MITI (metoda C.4-F) nie stosuje się ani rozpuszczalników, ani środków emulsyfikujących.

▼B

I.6.4. **Materiał inokulacyjny**

Inokulum może pochodzić z różnych źródeł: aktywowany osad, ścieki kanalizacyjne (niechlorowane), wody powierzchniowe i gleby lub ich mieszaniny. Dla badań DOC „Die-Away", wydzielania CO_2 i respirometrii manometrycznej, jeżeli stosowany jest aktywowany osad, powinien być pobrany z oczyszczalni ścieków i urządzeń skali laboratoryjnej przyjmujących głównie ścieki domowe. Materiał inokulacyjny z innych źródeł, okazał się dawać bardziej rozproszone wyniki. Dla zmodyfikowanego badania przesiewowego OECD i badania zamkniętej butli potrzebne jest bardziej rozcieńczone inokulum bez kłaczków osadu i zalecanym źródłem jest ściek drugiego stopnia oczyszczalnia ścieków domowych lub urządzeń skali laboratoryjnej. Dla badania MITI inokulum jest otrzymywane z mieszanych źródeł i opisane jest pod nagłówkiem tego specyficznego badania.

I.6.4.1. *Inokulum z aktywowanych osadów*

Zebrać świeżo pobraną próbkę aktywowanego osadu z komorą napowietrzania oczyszczalni ścieków lub urządzenia skali laboratoryjnej przerabiającego głównie ścieki domowe. Odrzucić duże cząstki, jeżeli konieczne poprzez filtracje przez siatkę o drobnym oczku i utrzymywać napowietrzanie.

Alternatywnie, zsedymentować lub odwirować (np. 1 100 rpm, 10 min) po usunięciu wszystkich dużych cząstek. Odrzucić nadsącz. Można przemyć osad w podłożu mineralnym. Zawiesić stężony osad w podłożu mineralnym dla uzyskania stężenia 3–5 g zawiesiny ciał stałych/l i napowietrzać do wymaganego momentu.

Osad powinien być pobrany z prawidłowo działającej konwencjonalnej oczyszczalni ścieków. Jeżeli pobrano osad z oczyszczalni o wysokiej szybkości oczyszczania lub podejrzewa się zawartość inhibitorów, należy go przemyć. Zsedymentować lub odwirować ponownie zawieszony osad po energicznym mieszaniu, odrzucić nadsącz i ponownie zawiesić umyty osad w dalszej objętości podłoża mineralnego. Powtarzać tę procedurę do czasu, gdy uzna się, iż jest wolny od nadmiaru substratów lub inhibitorów.

Po zakończeniu ponownego zawieszenia, lub niepoddany obróbce osad, odstawić ich próbkę do momentu jej użycia do ustalenia suchej masy ciał stałych w zawiesinie.

Dalszą alternatywą jest homogenizacja aktywowanego osadu (3–5 g zawiesiny ciał stałych/l). Rozdrobnić osad w mechanicznym rozdrabniaczu przy średniej szybkości przez 2 minuty. Zsedymentować rozdrobniony osad przez 30 minut lub dłużej, gdy trzeba, i zdekantować ciecz do użycia jako inokulum przy szybkości 10 ml/l podłoża mineralnego.

I.6.4.2. *Inne źródła inokulum*

Można je uzyskać ze ścieków drugiego stopnia oczyszczalni ścieków lub urządzeń skali laboratoryjnej przyjmujących głównie ścieki domowe. Zebrać świeżą próbkę i utrzymywać napowietrzaną w czasie transportu. Pozwolić osadzić się przez 1 godzinę lub przefiltrować przez grubą bibułę filtracyjną i zatrzymać zdekantowany wyciek lub jeśli wymagane przefiltrować z napowietrzaniem. Do 100 ml tego typu inokulum może być użyte na litr podłoża.

▼B

Następnym źródłem inokulum są wody powierzchniowe. W tym przypadku zebrać próbkę z odpowiedniej wody powierzchniowej, np. rzeki, jeziora i utrzymywać w napowietrzeniu przez wymagany czas. Jeżeli konieczne, zatężyć inokulum przez filtrację lub odwirowanie.

I.6.5. **Wstępne sezonowanie inokulum**

Materiał inokulacyjny może być wstępnie sezonowany do warunków eksperymentalnych, lecz niewstępnie adoptowany do badanej substancji. Wstępne sezonowanie składa się z napowietrzania aktywowanego osadu w podłożu mineralnym lub ścieku drugiego stopnia, przez 5–7 dni w temperaturze badania. Wstępne sezonowanie poprawia czasem precyzje metod badania przez zmniejszenie wartości dla ślepej próby. Uważane jest za niekonieczne wstępne sezonowanie inokulum dla metody MITI.

I.6.6. **Kontrole abiotyczne**

Gdy wymagane, sprawdzić możliwą abiotyczną degradację badanej substancji przez oznaczenie usuniętego DOC, pobieranie tlenu lub wydzielania ditlenku węgla w sterylnych kontrolach niezawierających inokulum. Sterylizować za pomocą filtracji przez membranę (0,2–0,45 mikrona) lub przez dodanie odpowiedniej toksycznej substancji o odpowiednim stężeniu. Jeżeli stosuje się filtracje membranową, pobrać próbki aseptycznie dla utrzymania sterylności. Chociaż absorpcję badanej substancji wykluczono z góry, badania, które mierzą biodegradację jako usuwanie DOC, szczególnie dla inokulum aktywowanego osadu, powinny zawierać kontrole abiotyczne, zaszczepione i intoksykowane.

I.6.7. **Liczba kolb**

Liczba kolb w typowym badaniu jest opisana pod nagłówkiem każdego badania.

Stosuje się następujące typy kolb:

— zawiesina badana: zawierających substancję badaną i inokulum,

— ślepa próba inokulum: zawierające tylko inokulum,

— kontrola procedury: zawierających substancje odniesienia i inokulum,

— kontrola sterylności abiotycznej: sterylne, zawierających substancję badaną (zob. I.6.6),

— kontrola adsorpcji: zawierających substancję badaną inokulum i środek sterylizujący,

— kontrola toksyczności: zawierających substancję badaną substancje odniesienia i inokulum.

Obowiązkowe jest, by oznaczenia w zawiesinie badanej i w ślepej próbie inokulum były wykonywane równolegle. Wskazane jest wykonywanie oznaczeń w innych kolbach również w oznaczeniach równoległych.

To jednakże nie zawsze jest możliwe. Upewnić się, że pobrano wystarczającą ilość próbek lub odczytów do oceny procentowego usunięcia DOC w 10-dniowym badaniu „okiennym”.

▼B

I.7. DANE I OCENA

W obliczeniu D_t zastosowano procent degradacji, średnie wartości zdublowanych pomiarów parametrów w obu badanych naczyniach i w ślepej próbie inokulum. Wzory są przedstawione w sekcjach poniżej właściwych badań. Przebieg degradacji jest zobrazowany graficznie i badanie 10-dniowe „okno" jest wskazane. Należy obliczyć i przedstawić w sprawozdaniu usunięcie procentowe uzyskane na koniec 10-dniowego „okna" i wartość w plateau, lub pod koniec badania, w zależności od tego, co jest odpowiednie.

W badaniach respirometrycznych związki zawierające azot mogą wpływać na pobieranie tlenu z powodu nitryfikacji (zob. załączniki II i V).

I.7.1. **Degradacja zmierzona za pomocą oznaczenia DOC**

Procentową degradację D_t przy każdym czasie pobierania próbki należy obliczyć oddzielnie dla kolb zawierających substancję badaną, stosując średnie wartości zdublowanych pomiarów DOC w celu oszacowania ważności badania (zob. I.5.2). Oblicza się to, stosując następujące równanie:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

gdzie:

D_t = % degradacji w czasie t,

C_0 = średnie początkowe stężenie DOC w zaszczepionym podłożu kultury zawierającym substancję badaną (mg DOC/l),

C_t = średnie stężenie DOC w zaszczepionym podłożu kultury zawierającym substancję badaną w czasie t (mg DOC/l),

C_{bo} = średnie początkowe stężenie DOC w zaszczepionym podłoże mineralnym ślepej próby (mg DOC/l),

C_{bt} = średnie stężenie DOC w zaszczepionym podłożu mineralnym ślepej próby w czasie t (mg DOC/l).

Wszystkie stężenia są mierzone eksperymentalnie.

I.7.2. **Degradacja mierzona w pojęciu właściwej analizy**

Gdy dostępne są dane z właściwej analizy, można obliczyć pierwotną biodegradację z:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

gdzie:

D_t = % degradacji w czasie t, zwykle 28 dni,

S_a = ilość pozostałości substancji badanej w zaszczepionym podłożu na koniec badania (mg),

S_b = ilość pozostałości substancji badanej w badaniu ślepej próby woda/podłoże, do którego dodano tylko substancję badaną (mg).

▼B

I.7.3. **Abiotyczna degradacja**

Gdy stosuje się kontrolę sterylną abiotyczną, obliczyć procentową abiotyczną degradację stosując

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

gdzie:

$C_{s(o)}$ = DOC stężenie w sterylnej kontroli w dniu 0,

$C_{s(t)}$ = DOC stężenie w sterylnej kontroli w dniu t.

I.8. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

W miarę możliwości sprawozdanie z badań zawiera następujące elementy:

— badana i chemiczne substancje odniesienia, i ich czystość,

— warunki badania,

— inokulum: natura i miejsce próbkowania(-ń), stężenie i wszystkie operacje przygotowania wstępnego,

— proporcja i charakter odpadu przemysłowego obecnego w ścieku, jeśli znany,

— czas trwania badania i temperatura,

— w przypadku słabo rozpuszczalnych badanych substancji, zastosowane operacje,

— zastosowana metoda badania; dla każdej zmiany procedury należy podać przyczyny uzasadnione naukowo i uzasadnienie,

— arkusz danych,

— wszystkie obserwowane zjawiska inhibicji,

— wszystkie obserwowane abiotyczne degradacje,

— dane właściwej analizy chemicznej, jeśli dostępne,

— dane analityczne etapów pośrednich, jeśli dostępne,

— wykres procentowy degradacji w stosunku do czasu dla substancji badanych i odniesienia; fazy opóźnienia, fazy degradacji, 10-dniowe „okno” oraz nachylenie wykresu należy wyraźnie wskazać (załącznik I). Jeżeli badanie odpowiadało kryteriom ważności, można użyć do wykresu średni procent degradacji w kolbach zawierających substancje badaną,

— procentowe usunięcie po 10-dniowym „oknie” i w plateau lub na koniec badania.

CZĘŚĆ II. **BADANIE DOC METODĄ „DIE-AWAY”** (Metoda C.4-A)

II.1. ZASADA METODY

Zmierzoną objętość zaszczepionego podłoża mineralnego, zawierającego znane stężenie substancji badanej (10–40 mg DOC/l), jako pojedyncze nominalne źródło węgla organicznego napowietrza się w ciemności lub w rozproszonym świetle w 22 ± 2 °C.

▼B

Postępującą degradację określa się analizą DOC w częstych przedziałach czasowych przez 28 dni. Stopień biodegradacji jest obliczany przez wyrażenie stężenia usuniętego DOC (skorygowanego do tego ze ślepej próby inokulum w kontroli) jako procent stężenia obecnego początkowo. Stopień pierwotnej biodegradacji może być także obliczony z dodatkowych analiz chemicznych wykonanych na początku i pod koniec inkubacji.

II.2. OPIS METODY

II.2.1. **Przyrząd**

a) Kolby stożkowe, np. 250 ml do 2 1, w zależności od objętości wymaganej dla analizy DOC.

b) Wytrząsarka do akomodacji kolb stożkowych – albo z automatyczną kontrolą temperatury, albo używaną w stałej temperaturze pokojowej, oraz wystarczająca moc dla utrzymania aerobowych warunków we wszystkich kolbach.

c) Przyrząd filtracyjny z odpowiednimi membranami.

d) Analizator DOC.

e) Przyrząd dla oznaczania rozpuszczonego tlenu.

f) Wirówka.

II.2.2. **Przygotowanie podłoża mineralnego**

W celu przygotowania roztworów podstawowych, zob. I.6.2.

Zmieszać 10 ml roztworu (a) z 800 ml wody rozcieńczającej, dodać 1 ml roztworu (b) do (d) i dopełnić do 1 l wodą rozcieńczającą.

II.2.3. **Przygotowanie wstępne inokulum**

Inokulum może być otrzymane z różnych źródeł: aktywowanego osadu, ścieków kanalizacyjnych, wód powierzchniowych, gleb lub z mieszaniny tu wymienionych.

Zob. I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 i I.6.5.

II.2.4. **Przygotowanie kolb**

Jako przykład wprowadzić porcje 800 ml podłoża mineralnego do 2 1 kolb stożkowych i dodać wystarczające objętości roztworów podstawowych substancji badanej i odniesienia do oddzielnych kolb dla uzyskania stężenia równoważnika chemicznego do 10–40 mg DOC/l. Sprawdzić wartość pH i ustawić, gdy konieczne, do 7,4. Przygotować materiał inokulacyjny w kolbach z aktywowanym osadem lub innym źródłem inokuli (zob. I.6.4) do uzyskania stężenia końcowego większego niż 30 mg zawiesiny ciał stałych/litr. Przygotować także kontrole inokulum w podłożu mineralnym, lecz bez badanej substancji i chemicznej substancji odniesienia.

Jeśli wymagane, użyć jedno naczynie dla sprawdzenia możliwych działań inhibicyjnych substancji badanej przez inokulację roztworu zawierającego w podłożu mineralnym, porównywalne stężenia substancji tak badanej, jak i chemicznej substancji odniesienia.

Także, jeżeli jest to wymagane, ustawić następną sterylną kolbę dla sprawdzenia, czy badana substancja degraduje się abiotycznie, używając niezaszczepiony roztwór substancji chemicznej (zob. I.6.6).

▼B

Dodatkowo, jeżeli podejrzewa się, że badana substancja zostanie zaabsorbowana znacząco w szkle, osadzie itp., wykonać wstępną ocenę prawdopodobnego wzrostu absorpcji, a zatem przydatności badania dla substancji chemicznej (zob. tabela 1). Nastawić kolby zawierające substancję badaną, inokulum i środek sterylizujący.

Dopełnić objętość we wszystkich kolbach do 11 podłożem mineralnym i po wymieszaniu pobrać próbkę z każdej kolby do oznaczenia początkowego stężenia DOC (zob. załącznik II.4). Przykryć otwory kolb np. aluminiową folią, w taki sposób by umożliwić swobodną wymianę powietrza między kolbą i otaczającą atmosferą. Następnie włożyć naczynia do wytrząsarki celem rozpoczęcia badania.

II.2.5. **Liczba kolb w typowym przebiegu**

Kolby 1 i 2: Zawiesina badana

Kolby 3 i 4: Ślepa próba inokulum

Kolba 5: Kontrola procedury

Zalecane oraz gdy konieczne:

Kolba 6: Kontrola sterylności abiotycznej

Kolba 7: Kontrola adsorpcji

Kolba 8: Kontrola toksyczności

Zob. także I.6.7.

II.2.6. **Przeprowadzenie badania**

Poprzez całe badanie oznaczać stężenia DOC w każdej kolbie duplikatu w znanych odstępach czasu, wystarczająco często, by można było oznaczyć 10-dniowe „okno” i usunięcie procentowe na koniec 10-dniowego „okna”. Pobrać tylko minimalną objętość zawiesiny badanej konieczną dla każdego oznaczenia.

Przed pobieraniem próbek zmniejszyć straty parowania z kolb przez dodanie wody rozcieńczającej (I.6.1) w wymaganej ilości, jeśli konieczne. Zamieszać energicznie podłoże kultury przed pobraniem próbki i upewnić się, że materiał przylegający do ścianek naczynia jest rozpuszczony lub zawieszony, przed pobieraniem próbek. Przefiltrować przez filtr membranowy lub odwirować (zob. załącznik II.4) natychmiast po pobraniu próbek. Analizować odfiltrowane lub odwirowane próbki tego samego dnia, w innym razie przechować w 2–4 ^{o}C przez maksimum 48 godzin, lub w niższej temperaturze - 18 ^{o}C przez czas dłuższy.

II.3. DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

II.3.1. **Obróbka wyników**

Obliczyć procentową degradację w czasie t, jak podano w I.7.1 (oznaczanie DOC), i – do wyboru – według I.7.2 (właściwa analiza).

Zapisać wszystkie wyniki na dołączonych arkuszach danych.

▼B

II.3.2. **Ważność wyników**

Zob. I.5.2.

II.3.3. **Sporządzanie sprawozdania**

Zob. I.8.

II.4. ARKUSZ DANYCH

Przykład arkusza danych podano poniżej.

BADANIE DOC METODĄ „DIE-AWAY”

1. **LABORATORIUM**

2. **DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA**

3. **SUBSTANCJA BADANA**

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: … mg/l jako substancja chemiczna.

Początkowe stężenie w podłożu, t_0: … mg/l jako substancja chemiczna.

4. **INOKULUM**

Źródło:

Poddano traktowaniu:

Wstępne sezonowanie, jeśli wykonano:

Stężenie zawiesiny ciał stałych w mieszaninie reakcyjnej: … mg/l

5. **OZNACZENIA WĘGLA**

Analizator węgla:

	Kolba nr		DOC po n dniach (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Badana substancja chemiczna plus ino-kulum	1	a_1					
		a_2					
		a, średnia $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, średnia $C_{b(t)}$					

▼B

	Kolba nr		DOC po n dniach (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Ślepa próba inoku-lum bez badanej substancji	3	C_1					
		C_2					
		c, średnia $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, średnia $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **OCENA DANYCH PIERWOTNYCH**

Kolba nr		% degradacja po n dniach				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Srednia (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 i D_2 nie należy uśredniać jeśli znacznie się różnią.

Uwaga: podobne arkusze można użyć dla chemicznej substancji odniesienia i kontroli toksyczności.

7. **KONTROLA ABIOTYCZNA** (do wyboru)

	Czas (dni)	
	0	t
DOC cone, (mg/l) kontrola sterylności	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotyczna degradacja} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **WŁAŚCIWA ANALIZA CHEMICZNA** (do wyboru)

	ilość pozostałości badanej substancji na koniec badania (mg/l)	% pierwotnej degradacji
Kontrola sterylności	S_b	

▼B

	ilość pozostałości badanej substancji na koniec badania (mg/l)	% pierwotnej degradacji
Zaszczepione podłoże badawcze	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

CZĘŚĆ III. **ZMODYFIKOWANE BADANIE PRZESIEWOWE OECD** (Metoda C.4-B)

III. 1. ZASADA METODY

Zmierzoną objętość podłoża mineralnego zawierające znane stężenie substancji badanej (10–40 mg DOC/litr) jako nominalne pojedyncze źródło węgla organicznego, zaszczepiono za pomocą 0,5 ml wycieku na litr podłoża. Mieszaninę napowietrza się w ciemności lub w rozproszonym świetle w 22 ± 2 °C.

Postępującą degradację określa się analizą DOC w częstych przedziałach czasowych przez 28 dni. Stopień biodegradacji jest obliczany przez wyrażenie stężenia usuniętego DOC (skorygowanego do tego ze ślepej próby inokulum w kontroli) jako procent stężenia obecnego początkowo. Stopień pierwotnej biodegradacji może być także obliczony z dodatkowych analiz chemicznych wykonanych na początku i pod koniec inkubacji.

III.2. OPIS METODY

III.2.1. Przyrząd

a) Kolby stożkowe, np. 250 ml do 2 1, w zależności od objętości wymaganej dla analizy DOC.

b) Wytrząsarka do akomodacji kolb stożkowych – albo z automatyczną kontrolą temperatury, albo używaną w stałej temperaturze pokojowej, oraz wystarczająca moc dla utrzymania aerobowych warunków we wszystkich kolbach.

c) Przyrząd filtracyjny z odpowiednimi membranami.

d) Analizator DOC.

e) Przyrząd dla oznaczania rozpuszczonego tlenu.

f) Wirówka.

III.2.2. **Przygotowanie podłoża mineralnego**

W celu przygotowania roztworów podstawowych, zob. I.6.2.

Zmieszać 10 ml roztworu (a) z 80 ml wody rozcieńczającej, dodać 1 ml roztworu (b) do (d) i dopełnić do 1 litra wodą rozcieńczającą.

Niniejsza metoda wykorzystuje tylko 0,5 ml wycieku/litr jako inokulum i dlatego podłoże może wymagać wzmocnienia śladowymi pierwiastkami i czynnikami wzrostu. Wykonuje się to przez dodanie 1 ml każdego z następujących roztworów, na litr końcowego podłoża:

▼B

Roztwór pierwiastków śladowych:

Siarczan manganu tetrawodny $MnSO_4$. 4 H_2O	39,9 mg
Kwas borowy, H_3BO_3	57,2 mg
Siarczan cynku heptawodny $ZnSO_4$. 7 H_2O	42,8 mg
Heptamolibdenian amonu $(NH_4)_6$ Mo_7O_{24}	34,7 mg
Fe-chelata ($FeCl_3$ kwasu etylenodiaminotetraoctowego)	100,0 mg
Rozpuścić w i dopełnić do 1 000 ml wodą rozcieńczającą	
Roztwór witaminowy:	
Ekstrakt drożdży	15,0 mg

Rozpuścić ekstrakt drożdży w 100 ml wody. Sterylizować przez przepuszczenie przez membranę 0,2 mikrona, lub przygotować na świeżo.

III.2.3. **Przygotowanie wstępne inokulum**

Inokulum może być otrzymane ze ścieków drugiego stopnia oczyszczalni ścieków lub urządzeń skali laboratoryjnej przyjmujących głownie ścieki domowe (zob. I.6.4.2 i I.6.5).

Stosuje się 0,5 ml na litr podłoża mineralnego.

III.2.4. **Przygotowanie kolb**

Jako przykład wprowadzić porcje 800 ml podłoża mineralnego do 2-litrowych kolb stożkowych i dodać wystarczające objętości roztworów podstawowych substancji badanej i odniesienia do oddzielnych kolb dla uzyskania stężenia równoważnika chemicznego do 10–40 mg DOC/l. Sprawdzić wartość pH i ustawić, gdy konieczne, do 7,4. Zaszczepić kolby wyciekiem ściekowym 0,5 ml/litr (zob. I.6.4.2). Przygotować także kontrole inokulum w podłożu mineralnym, lecz bez badanej substancji i chemicznej substancji odniesienia.

Jeśli wymagane, użyć jedno naczynie dla sprawdzenia możliwych działań inhibicyjnych substancji badanej przez inokulację roztworu zawierającego w podłożu mineralnym, porównywalne stężenia substancji tak badanej, jak i chemicznej substancji odniesienia.

Także, jeżeli jest to wymagane, ustawić następną sterylną kolbę dla sprawdzenia, czy badana substancja degraduje się abiotycznie, używając niezaszczepiony roztwór substancji chemicznej (zob. I.6.6).

Dodatkowo, jeżeli podejrzewa się, że badana substancja zostanie zaabsorbowana znacząco w szkle, osadzie itp., wykonać wstępną ocenę prawdopodobnego wzrostu absorpcji, a zatem przydatności badania dla substancji chemicznej (zob. tabela 1). Nastawić kolby zawierające substancję badaną, inokulum i środek sterylizujący.

Dopełnić objętość we wszystkich kolbach do 1 litra podłożem mineralnym i po wymieszaniu pobrać próbkę z każdej kolby do oznaczenia początkowego stężenia DOC (zob. załącznik II.4). Przykryć otwory kolb np. aluminiową folią, w taki sposób by umożliwić swobodną wymianę powietrza między kolbą i otaczającą atmosferą. Następnie włożyć naczynia do wytrząsarki celem rozpoczęcia badania.

▼B

III.2.5. **Liczba kolb w typowym przebiegu**

Kolby 1 i 2: Zawiesina badana

Kolby 3 i 4: Ślepa próba inokulum

Kolba 5: Kontrola procedury

i zalecane oraz gdy konieczne:

Kolba 6: Kontrola sterylności abiotycznej

Kolba 7: Kontrola adsorpcji

Kolba 8: Kontrola toksyczności

Zob. także I.6.7.

III.2.6. **Przeprowadzenie badania**

Poprzez całe badanie oznaczać stężenia DOC w każdej kolbie duplikatu w znanych odstępach czasu, wystarczająco często, by można było oznaczyć 10-dniowe „okno" i usunięcie procentowe na koniec 10-dniowego „okna". Pobrać tylko minimalną objętość zawiesiny badanej konieczna dla każdego oznaczenia.

Przed pobieraniem próbek zmniejszyć straty parowania z kolb przez dodanie wody rozcieńczającej (I.6.1) w wymaganej ilości, jeśli konieczne. Zamieszać energicznie podłoże kultury przed pobraniem próbki i upewnić się że materiał przylegający do ścianek naczynia jest rozpuszczony lub zawieszony, przed pobieraniem próbek. Przefiltrować przez filtr membranowy lub odwirować (zob. załącznik II.4) natychmiast po pobraniu próbek. Analizować odfiltrowane lub odwirowane próbki tego samego dnia, w innym razie przechować w 2–4 ^{o}C przez maksimum 48 godzin, lub w niższej temperaturze - 18 ^{o}C przez czas dłuższy.

III.3. DANE AND SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

III.3.1. **Obróbka wyników**

Obliczyć procentową degradację w czasie t, jak podano w I.7.1 (oznaczanie DOC), i – do wyboru – pod I.7.2. (właściwa analiza).

Zapisać wszystkie wyniki na dołączonych arkuszach danych.

III.3.2. Ważność wyników

Zob. I.5.2.

III.3.3. Sporządzanie sprawozdania

Zob. I.8.

III.4. ARKUSZ DANYCH

Przykład arkusza danych podano poniżej.

ZMODYFIKOWANE BADANIE PRZESIEWOWE OECD

1. **LABORATORIUM**

2. **DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA**

▼B

3. **SUBSTANCJA BADANA**

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: … mg/litr jako substancja chemiczna

Początkowe stężenie w podłożu, t_o: … mg/litr jako substancja chemiczna

4. **INOKULUM**

Źródło:

Poddano traktowaniu:

Wstępne sezonowanie, jeśli wykonano:

Stężenie zawiesiny ciał stałych w mieszaninie reakcyjnej: mg/l

5. **OZNACZENIA WĘGLA**

Analizator wegla:

	Kolba nr		DOC po n dniach (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Badana substancja chemiczna plus inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, średnia $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, średnia $C_{b(t)}$					
Ślepa próba inokulum bez badanej substancji	3	C_1					
		C_2					
		c, średnia $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, średnia $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **OCENA DANYCH PIERWOTNYCH**

Kolba nr		% degradacja po n dniach				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Kolba nr		% degradacja po n dniach				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Srednia (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 i D_2 nie mogą być uśrednian, jeżeli znacznie się różnią.

Uwaga: podobne arkusze można stosować dla chemicznej substancji odniesienia i kontroli toksyczności.

7. **KONTROLA ABIOTYCZNA** (do wyboru)

	Czas (dni)	
	0	t
DOC cone, (mg/l) kontrola sterylności	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\%\ \text{abiotycznadegradacja} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **WŁAŚCIWA ANALIZA CHEMICZNA** (do wyboru)

	ilość pozostałości badanej substancji na koniec badania (mg/1)	% pierwotnej degradacji
Kontrola sterylności	S_b	
Zaszczepione podłoże badawcze	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

CZĘŚĆ IV. BADANIE WYDZIELANIA CO_2 (Metoda C.4-C)

IV.1. ZASADA METODY

Zmierzona objętość zaszczepionego podłoża mineralnego, zawierającego znane stężenie badanej substancji (10–20 mg DOG lub TOC/l) jako nominalne pojedyncze źródło węgla organicznego, jest napowietrzana przez przepuszczanie powietrza wolnego od ditlenku węgla z kontrolowaną szybkością w ciemności lub rozproszonym świetle. Degradacja jest prowadzona przez 28 dni przez oznaczanie wytwarzanego ditlenku węgla, który jest pochłaniany w wodorotlenku sodowym lub barowym i mierzony za pomocą miareczkowania pozostałego wodorotlenku lub jako nieorganiczny węgiel. Ilość ditlenku węgla wydzielonego z badanej substancji (skorygowana dla tej uzyskanej ze ślepej próby inokulum) jest wyrażana jako procent $ThCO_2$. Stopień biodegradacji można także obliczyć z dodatkowej analizy DOG wykonanej na początku i końcu inkubacji.

▼B

IV.2. OPIS METODY

IV.2.1. **Przyrząd**

a) Kolby, 2–5 litra, każda zaopatrzona w rurkę napowietrzającą sięgającą blisko dna naczynia i w wylot.

b) Mieszadła magnetyczne przy ocenie słabo rozpuszczalnych substancji chemicznych.

c) Butle absorpcji gazu.

d) Urządzenia do kontroli i pomiaru przepływu powietrza.

e) Przyrząd do przemywania ditlenku węgla, dla przygotowania powietrza wolnego od ditlenku węgla; alternatywnie mieszanina tlenu i azotu wolnych od ditlenku węgla z butli gazowych, używane w prawidłowej proporcji (20 % O_2: 80 % N_2).

f) Przyrząd do oznaczania ditlenku węgla – albo miareczkowaniem, albo jedną z postaci analizatora węgla nieorganicznego.

g) Urządzenie filtracji membranowej (do wyboru).

h) Analizator DOG (do wyboru).

IV.2.2. **Przygotowanie podłoża mineralnego**

W celu przygotowania roztworów podstawowych zob. I.6.2.

Zmieszać 10 ml roztworu (a) z 800 ml wody rozcieńczającej, dodać 1 ml roztworu (b) do (d) i dopełnić do 1 l wodą rozcieńczającą.

IV.2.3. **Przygotowanie wstępne inokulum**

Inokulum można otrzymać z różnych źródeł: aktywowany osad; ścieki kanalizacyjne; wody powierzchniowe; gleby lub z mieszaniny tu wymienionych.

Zob. I.6.4., I.6.4.1, I.6.4.2 i I.6.5.

IV.2.4. **Przygotowanie kolb**

Przykładowo wskazano następujące objętości i wagi dla 5-litrowych kolb zawierających 3 litry zawiesiny. Jeżeli używa się mniejszych objętości, należy je odpowiednio zmodyfikować, ale należy zapewnić że utworzony ditlenek węgla zostanie zmierzony dokładnie.

Do każdej 5-litrowej kolby dodać 2 400 ml podłoża mineralnego. Dodać odpowiednią objętość przygotowanego aktywowanego osadu (zob. I.6.4.1 i I.6.5) dla otrzymania stężenia zawiesiny ciał stałych niewiększego niż 30 mg/l w końcowej 3-litrowej zaszczepionej mieszaninie. Alternatywnie, rozcieńczyć wpierw przygotowany osad do uzyskania zawiesiny 500–1 000 mg/l w podłożu mineralnym przed dodaniem podwielokrotności do zawartości 5-litrowej kolby, dla uzyskania stężenia 30 mg/l; zapewnia to większą dokładność. Można użyć innych źródeł inokulum (zob. I.6.4.2).

Napowietrzać te zaszczepione mieszaniny powietrzem wolnym od ditlenku węgla przez noc celem przepłukania systemu z ditlenku węgla.

▼B

Dodać badany materiał oraz substancje odniesienia oddzielnie, jako znaną objętość roztworów podstawowych, do replikowanych kolb dla uzyskania stężeń wnoszących udział przez dodane substancje chemiczne, 10 do 20 mg DOC lub TOC/l; pozostawić kilka kolb bez dodawania substancji chemicznych jako kontrole inokulum. Dodać badane słabo rozpuszczalne substancje bezpośrednio do kolb na podstawie masy lub objętości lub postępować jak opisano w załączniku III.

Jeżeli wymagane, użyć jedną kolbę do sprawdzenia możliwego działania inhibicyjnego badanej substancji przez dodanie zarówno badanej jak i substancji odniesienia, w tych samych stężeniach jak obecne w innych kolbach.

Także, jeżeli wymagane, użyć sterylnej kolby do sprawdzenia czy badana substancja jest degradowana abiotycznie przez użycie niezaszczepionego roztworu substancji chemicznej (zob. I.6.6). Sterylizować przez dodanie substancji toksycznej o odpowiednim stężeniu.

Dopełnić objętości zawiesin we wszystkich kolbach do 3l dodając podłoże mineralne uprzednio napowietrzone powietrzem wolnym od CO_2. Alternatywnie, można pobrać próbki do analizy DOC (zob. załącznik II.4) i/lub właściwej analizy. Podłączyć butle absorpcyjne do wylotów powietrza kolb.

Jeżeli używany jest wodorotlenek baru, połączyć trzy butle absorpcyjne, każda zawierająca 100 ml 0,0125 M roztworu wodorotlenku baru, w seriach do kazdej 5-litrowej kolby. Roztwór musi być wolny od wytrąconych siarczanów oraz węglanów i jego stężenie musi być oznaczone bezpośrednio przed użyciem. Jeżeli używa się wodorotlenek sodu, podłączyć dwie pułapki, druga działa jako kontrola pokazania, że cały ditlenek węgla został zaabsorbowany w pierwszej. Butle absorpcyjne wyposażone w zamknięcia typu kroplówkowego są odpowiednie. Dodać 200 ml 0,05 M wodorotlenku sodu do każdej butli, która jest odpowiednia do zaabsorbowania całkowitej ilości ditlenku węgla wydzielonego po całkowitej degradacji badanej substancji. Roztwory wodorotlenku sodu, nawet świeżo przygotowane, mogą zawierać ślady węglanów; jest to korygowane przez odjęcie węglanów ze ślepej próby.

IV.2.5. **Liczba kolb w typowym przebiegu**

Kolby 1 i 2: Zawiesina badana

Kolby 3 i 4: Ślepa próba inokulum

Kolba 5: Kontrola procedury

oraz zalecane i gdy konieczne:

Kolba 6: Kontrola sterylności abiotycznej

Kolba 7: Kontrola toksyczności

Kolba 8: Kontrola toksyczności

Zob. także I.6.7.

IV.2.6. **Przeprowadzenie badania**

Rozpocząć badanie przez wpuszczenie pęcherzyków powietrza wolnego od ditlenku węgla przez zawiesiny z szybkością 30–100 ml/min. Pobierać próbki absorbenta ditlenku węgla okresowo do analiz na zawartość CO_2. W trakcie pierwszych dziesięciu dni zalecane jest, by analizy były wykonywane co drugi lub trzeci dzień, a następnie co piąty, aż do 28 dnia, tak by okres 10-dniowego okna był zidentyfikowany.

▼B

W dniu 28 pobrać próbki (do wyboru) do analizy DOC i/lub właściwej analizy, pomierzyć pH zawiesin i dodać 1 ml stężonego kwasu solnego do każdej kolby; napowietrzać przez noc do wypędzenia ditlenku węgla obecnego w badanych zawiesinach. Dnia 29 wykonać analizę wydzielonego ditlenku węgla.

W dniu pomiaru CO_2 rozłączyć absorber wodorotlenku baru najbliższy kolby i zmiareczkować roztwór wodorotlenku za pomocą HCl 0,05 M, stosując fenoloftaleinę jako wskaźnik. Przesunąć pozostałe absorbery o jedno miejsce bliżej kolby i umieścić nowy absorber zawierający 100 ml świeżego 0,0125 M wodorotlenku baru na dalszym końcu serii. Wykonać miareczkowania według potrzeby, na przykład gdy podstawowe strącenie jest widoczne w pierwszej pułapce i przed strąceniem w drugim, lub co najmniej co tydzień. Alternatywnie, z NaOH jako absorbentem, pobrać strzykawką małą próbkę (w zależności od charakterystyki stosowanego analizatora węgla) roztworu wodorotlenku sodu z absorbera najbliższego kolbie. Wstrzyknąć próbkę do części IC analizatora węgla do bezpośredniej analizy wydzielonego ditlenku węgla.

Analizować zawartość drugiej pułapki tylko na koniec badania dla skorygowania przenoszenia ditlenku węgla.

IV.3. DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

IV.3.1. **Obróbka wyników**

Ilość CO_2 zatrzymana w absorberze przy miareczkowaniu jest dana przez:

$$\text{mg } CO_2 = (100 \times C_B 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

gdzie:

V = objętość HCl użytego do miareczkowania 100 ml w absorberze (ml),

C_B = stężenie roztworu wodorotlenku baru (M),

C_A = stężenie roztworu kwasu solnego (M),

jeśli C_B wynosi 0,0125 M i C_A jest 0,05 M, miareczkowanie 100 ml wodorotlenku baru daje 50 ml, a waga CO_2 jest dana przez:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI miareczkującego} = 1{,}1 \times \text{ml HCI}$$

Zatem w tym przypadku dla przeliczenia objętości HCl miareczkującego na wytworzone miligramy CO_2, współczynnik wynosi 1,1.

Obliczyć wagi wytworzonego CO_2 z samego inokulum oraz z inokulum plus badana substancja używając odnośne wartości miareczkowania, a różnica jest wagą CO_2 wytworzonego przez samą badaną substancję.

Przykładowo, jeżeli samo inokulum daje zmiareczkowane 48 ml oraz inokulum plus badana substancja daje 45 ml,

$$CO_2 \text{ z inokulum} = 1{,}1 \times (50 - 48) = 2{,}2 \text{ mg}$$

▼B

CO_2 z inokulum plus badana substancja = 1,1 × (50 – 45) = 5,5 mg

Zatem waga CO_2 wytworzonego z badanej substancji wynosi 3,3 mg.

Procentowa biodegradacja jest obliczana z:

$$\%\text{degradacja} = \frac{\text{mg } CO_2\text{wytworz} \times 100}{\text{Th}CO_2 \times \text{mg dodanej substancji badanej}}$$

lub,

$$\%\ \text{degradacja} = \frac{\text{mg } CO_2\text{wytworzory} \times 100}{\text{mg TOC dodanego wbadaniu} \times 3{,}67}$$

3,67 istniejący współczynnik konwersji (44/12) węgla do ditlenku węgla.

Uzyskać procentową degradację po każdym przedziale czasu przez dodanie stosunków procentowych wartości $ThCO_2$ obliczonych dla każdego z dni, do czasu w jakim zmierzono.

Dla absorberów z wodorotlenkiem sodu, obliczyć ilość wytworzonego ditlenku węgla, wyrażając jako IC (mg), przez pomnożenie stężenia IC w absorbencie przez objętość absorbenta.

Obliczyć procentową degradację z:

$$\%\ \text{of } \text{Th}CO_2 = \frac{\text{mg IC zbadanej kolby} - \text{mg IC ześlepej próby}}{\text{MG TOC dodanego jako substancja badana}} \times 100$$

Obliczyć usunięcie DOC (do wyboru) jak opisano pod I.7. Zapisać te i wszystkie inne wyniki na przygotowanych arkuszach danych.

IV.3.2. **Ważność wyników**

Zawartość IC zawiesiny badanej substancja w podłożu mineralnym na początku badania musi być mniejsza niż 5 % wartości TC, a całkowite wydzielanie CO_2 w ślepej próbie z inokulum na końcu badania nie powinna zwykle przekraczać 40 mg/l podłoża. Jeżeli uzyskuje się wartości wyższe niż 70 mg CO_2/litr, dane i technika eksperymentalna muszą być krytycznie przebadane.

Zob. także I.5.2.

IV.3.3. **Sporządzanie sprawozdania**

Zob. I.8.

IV.4. ARKUSZ DANYCH

Przykład arkusza danych podano poniżej.

BADANIE WYDZIELANIA DITLENKU WĘGLA

1. **LABORATORIUM**

2. **DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA**

3. **SUBSTANCJA BADANA**

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: … mg/litr jako substancja chemiczna

▼B

Wstępne stężenie. w podłożu: … mg/litr jako substancja chemiczna

Całkowity C dodany do kolby: … mg C

$ThCO_2$: mg CO_2

4. **INOKULUM**

Źródło:

Poddano traktowaniu:

Przygotowanie wstępne, o ile stosowano:

Stężenie zawiesiny ciał stałych w mieszaninie reakcyjnej: mg/litr

5. **WYTWARZANIE DITLENKU WĘGLA I DEGRADOWALNOŚĆ**

Metoda: Ba(OH)/NaOH/inne

Czas (dzień)	CO_2 utworzonego w badaniu (mg)		CO_2 utworzonego w ślepej próbie (mg)		CO_2 utworzony zbiorczo (mg) (badanie minus średnia ślepej próby)		$\text{zbiorczo } \frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	średnia	3 / 4	średnia	1	2	1	2	średnia
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Uwaga: podobne arkusze mogą być używane dla chemicznej substancji odniesienia i kontroli toksyczności

6. **ANALIZA WĘGLA** (do wyboru)

Analizator węgla:

Czas (dzień)	Ślepa próba mg/l	Badana substancja chemiczna mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_0
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) lub w końcu inkubacju

▼B

$$\% \text{ DOC usuniętego} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **DEGRADACJA ABIOTYCZNA** (do wyboru)

$$\% \text{ abiotycznejdegradacji} = \frac{CO_2 - CO_2 \text{ utworzonego wkolbie (starlite)po 28 dniach (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

CZĘŚĆ V. **BADANIE RESPIROMETRII MANOMETRYCZNEJ** (Metoda C.4-D)

V.1. ZASADA METODY

Zmierzona objętość zaszczepionego podłoża mineralnego, zawierającego znane stężenie badanej substancji (100 mg/litr substancji badanej, dająca co najmniej 50–100 mg ThOD/litr) jako nominalnego pojedynczego źródła węgla organicznego, jest mieszana w zamkniętej kolbie w stałej temperaturze (± 1° C lub bliżej) do 28 dnia włącznie. Zużycie tlenu jest oznaczane albo przez pomiary ilości tlenu (wytwarzanego elektrolitycznie) wymaganego do utrzymania stałej objętości gazu w kolbie respirometru, lub przez zmianę w objętości lub ciśnieniu (lub w kombinacji dwóch) w aparacie. Wydzielany ditlenek węgla jest absorbowany w roztworze wodorotlenku potasu lub w innym odpowiednim absorbencie. Ilość tlenu pobrana przez badaną substancję (skorygowana o pobór w ślepej próbie z inokulum, biegnącej równolegle) jest wyrażana jako stosunek procentowy ThOD lub COD. Alternatywnie, pierwotna biodegradacja może być także obliczona z dodatkowych właściwych analiz wykonanych na początku i końcu inkubacji, i ostatecznie przez analizę DOC.

V.2. OPIS METODY

V.2.1. **Przyrząd**

a) odpowiedni respirometr;

b) regulator temperatury, utrzymujący ± 1 °C lub lepszą;

c) urządzenie do filtracji membranowej (do wyboru);

d) analizator węgla (do wyboru).

V.2.2. **Przygotowanie podłoża mineralnego**

W celu przygotowania roztworów podstawowych, zob. I.6.2.

Zmieszać 10 ml roztworu (a) z 800 ml wody rozcieńczającej, dodać 1 ml roztworu (b) do (d) i dopełnić do 1 litra wodą rozcieńczającą.

V.2.3. **Przygotowanie i przygotowanie wstępne inokulum**

Inokulum może być uzyskane z różnych źródeł: aktywowany osad; ścieki kanalizacyjne; wody powierzchniowe i gleby lub mieszanina wymienionych.

Zob. I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. i I.6.5.

V.2.4. **Przygotowanie kolb**

Przygotować roztwory badane oraz chemicznej substancji odniesienia, w oddzielnych partiach, w podłożu mineralnym równoważnym stężeniu, zwykle 100 mg substancji chemicznej/litr (dający co najmniej 50–100 mg ThOD/litr), stosując roztwory podstawowe.

▼B

Obliczyć ThOD na podstawie tworzenia się soli amonowych, poza spodziewaną nitryfikacją, dla której należy oprzeć obliczenia na tworzeniu się azotanów (zob. załącznik II.2.)

Oznaczyć wartości pH i jeśli konieczne, ustawić na 7,4 ± 0,2.

Substancje słabo rozpuszczalne należy dodawać na dalszym etapie (zob. poniżej).

Jeżeli ma być ustalona toksyczność badanej substancji, przygotować dalszy roztwór z podłoża mineralnego zawierającego zarówno substancję badaną jak i chemiczną substancję odniesienia o tych samych stężeniach co w poszczególnych roztworach.

Jeżeli wymagany jest pomiar fizyko-chemicznego poboru tlenu, przygotować roztwór badanej substancji zwykle 100 mg ThOD/litr który został sterylizowany dodatkiem odpowiedniej toksycznej substancji (zob. I.6.6).

Wprowadzić konieczne objętości roztworów badanej substancji i chemicznej substancji odniesienia, odpowiednio, w co najmniej zdublowanych kolbach. Dodać do następnych kolb tylko podłoże mineralne (dla kontroli inokulum) i, jeśli wymagane, zmieszane roztwory substancja badana/substancja odniesienia i roztwór sterylny.

Jeśli badana substancja chemiczna jest słabo rozpuszczalna, dodać ją bezpośrednio na niniejszym etapie na podstawie wagi lub objętości lub postępować jak opisano w dodatku III. Dodać wodorotlenek potasu, tabletki wapna sodowanego lub innego absorbenta do zbiorników absorbera CO_2.

V.2.5. **Liczba kolb w typowym przebiegu**

Kolby 1 i 2: Zawiesina badana

Kolby 3 i 4: Ślepa próba inokulum

Kolba 5: Kontrola procedury

Zalecane i gdy konieczne:

Kolba 6: Kontrola sterylna

Kolba 7: Kontrola toksyczności

Kolba 8: Kontrola toksyczności

Zob. także I.6.7.

V.2.6. **Przeprowadzenie badania**

Pozwolić na uzyskanie przez naczynia żądanej temperatury i zaszczepić odpowiednie naczynia przygotowanym aktywowanym osadem lub innym źródłem inokulum by otrzymać stężenie zawiesiny ciał stałych niewiększe niż 30 mg/litr. Zestawić wyposażenie, włączyć mieszanie i sprawdzić szczelność, rozpocząć pomiar pobierania tlenu. Zwykle niewymagana jest dalsza uwaga inna niż zbieranie koniecznych danych i wykonywanie codziennych sprawdzeń czy jest utrzymywane są właściwa temperatura i stosowne mieszanie.

Obliczyć pobieranie tlenu z odczytów zbieranych w regularnych i częstych przedziałach czasowych, stosując metody podane przez producenta wyposażenia. Pod koniec inkubacji, zwykle 28-dniowej, zmierzyć pH zawartości kolb, szczególnie jeśli pobieranie tlenu jest niższe lub większe niż $ThODNH_4$ (dla związków zawierających azot).

▼B

Jeżeli wymagane, pobrać próbki z kolb respiratora, początkowej i końcowej, do analizy DOC lub właściwej chemicznej (zob. załącznik II.4). Przy początkowym pobieraniu upewnić się, że objętość zawiesiny badanej pozostającej w kolbie jest znana. Gdy tlen zostanie pobrany przez substancję badaną zawierającą azot, oznaczyć wzrost stężenia azotynów oraz azotanów przez okres 28 dni i obliczyć poprawkę dla tlenu zużytego przez nitryfikację (załącznik V).

V.3. DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

V.3.1. **Obróbka wyników**

Podzielić pobór tlenu (mg) przez badaną substancję po danym czasie (skorygować o tę ze ślepej kontroli inokulum po tym samym czasie) przez wagę użytej badanej substancji. Da to BOD wyrażone jako mg tlenu/mg badanej substancji, czyli

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ pobór przez badaną substancje} - \text{mg } O_2 \text{ pobrane wślepej próbie})}{(\text{mg badanej substancji wkolbie})}$$

= mg O_2 na mg badanej substancji.

obliczyć procentową biodegradacje albo z:

$$\%\ \text{biodegradacja} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg subst. badanej})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2 \text{ subst badanej})} \times 100$$

lub postaci

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg subst badanej})}{\text{COD}(\text{mg } O_2 \text{ subst badanej})} \times 100$$

Należy zauważyć że te dwie metody niekoniecznie muszą dawać te same wartości; korzystniejsze jest użycie pierwszej metody.

Dla badanych substancji zawierających azot stosuje się odpowiednie ThOD (NH_4 lub $N0_3$) zgodnie z tym co jest znane lub oczekiwane o zajściu nitryfikacji (załącznik II.2). Jeżeli nitryfikacja zachodzi, lecz nie jest całkowita, obliczyć poprawkę dla tlenu zużytego przez nitryfikację ze zmian w stężeniu azotynów i azotanów (załącznik V).

Gdy wykonano alternatywne oznaczenia węgla organicznego i/lub właściwej substancji chemicznej, obliczyć procentową degradację, jak opisano pod I.7.

Zapisać wszystkie wyniki na dołączonych arkuszach danych.

V.3.2. **Ważność wyników**

Pobieranie tlenu w ślepej próbie z inokulum jest zwykle 20–30 mg O_2/litr i powinno być niewiększe niż 60 mg/litr w ciągu 28 dni. Wartości wyższe od 60 mg/litr wymagają krytycznego sprawdzenia danych i technik eksperymentalnych. Jeżeli wartość pH jest poza zakresem 6–8,5, a zużycie tlenu przez badaną substancję jest mniejsze niż 60 %, należy powtórzyć badanie z niższym stężeniem badanej substancji.

Zob. także 1.5.2.

▼B

V.3.3. **Sporządzanie sprawozdania**

Zob. 1.8.

V.4. **ARKUSZ DANYCH**

Przykład arkusza danych podano poniżej.

BADANIE RESPIROMETRII MANOMETRYCZNEJ

1. **LABORATORIUM**

2. **DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA**

3. **SUBSTANCJA BADANA**

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: … mg/litr

Początkowe stężenie w podłożu, C : … mg/litr

Objętość w kolbie do badań (V): ml

ThOD lub COD: mg O_2/mg substancji badanej (NH_4, $N0_3$)

4. **INOKULUM**

Źródło:

Poddano traktowaniu:

Wstępne sezonowanie, o ile wykonano:

Stężenie zawiesiny ciał stałych w mieszaninie reakcyjnej: … mg/l

5. **POBÓR TLENU: BIODEGRADOWALNOŚĆ**

		Czas (dni)											
		0		7		14			21			28	
O_2 pobór (mg) badana substancja	1												
	2												
	a, średnia												
O_2 pobór (mg)	3												
	4												
	b, średnia												
skorygowane BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD na mg badanej substancji	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Czas (dni)											
		0		7		14			21			28	
% degradacja $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	średnia (*)												

V = objętość podłoża w kolbie do badań
(*) D_1 i D_2 nie należy uśredniać jeśli się znacząco różnią.

Uwaga: Podobne arkusze używać można do chemicznej substancji odniesienia i kontroli toksyczności

6. **POPRAWKA DLA NITRYFIKACJI** (zob. załącznik V)

Dzien		0	28	Roznica
(i)	Steżenie azotanów (mg N/litr)			(N)
(ii)	równoważnik tlenu (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii)	Steżenie azotynów (mg N/litr)			(N)
(iv)	równoważnik tlenu (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Całkowity równoważnik tlenu	—	—	

7. **ANALIZA WĘGLA** (alternatywna)

Analizator węgla:

Czas (dzień)	Ślepa proba mg/litr	Badana substancja chemiczna mg/litr
0	(C_{blo})	(C_0)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) lub w końcu inkubacji

$$\% \text{ DOC usuniętego} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **WŁASCIWA CHEMICZNA** (alternatywna)

S_b = stężenie w fizyko-chemicznej (sterylnej) kontroli w 28 dniu

S_a = stężenie w zaszczepionej kolbie w 28 dniu

$$\% \text{ biodegradacji} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **DEGRADACJA ABIOTYCZNA** (alternatywna)

a = zużycie tlenu w sterylnej kolbie po 28 dniach, (mg)

$$\text{zużycie tlenu na mg badanej substancji} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(zob. sekcje 1 i 3)

$$\% \text{ abiotycznadegradacja} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

CZĘŚĆ VI. **BADANIE „ZAMKNIĘTEJ BUTLI”** (Metoda C.4-E)

VI. 1. ZASADA METODY BADANIA

Roztwór badanej substancji w podłożu mineralnym, zwykle 2–5 mg/litr, jest zaszczepiany relatywnie małą liczbą drobnoustrojów ze zmieszanej populacji i trzymany w całkowicie pełnej, zamkniętej butli w ciemności w stałej temperaturze. Degradacja jest oznaczana przez analizę rozpuszczonego tlenu przez okres czasu 28 dni. Ilość tlenu pobrana przez badaną substancję, skorygowany o pobór w równoległej ślepej próbie z inokulum, jest wyrażona jako stosunek procentowy ThOD lub COD.

VI.2. OPIS METODY

VI.2.1. **Przyrząd**

a) Butle BOD, ze szklanymi korkami, np. 250–300 ml.

b) Łaźnia wodna lub inkubator, dla trzymania butli w stałej temperaturze (± 1 °C lub lepiej) przy wyłączonym świetle.

c) Duże szklane butle (2–5 litrów) dla przygotowania podłoża i napełniania butli BOD.

d) Elektroda tlenowa i miernik, lub wyposażenie oraz odczynniki dla miareczkowania Winklera.

VI.2.2. **Przygotowanie podłoża mineralnego**

W celu przygotowania roztworów podstawowych zob. 1.6.2.

Zmieszać 1 (jeden) ml roztworu (a) z (d) i dopełnić do 1 litra wodą rozcieńczającą.

VI.2.3. **Przygotowanie inokulum**

Inokulum jest zwykle uzyskiwane ze ścieku drugiego stopnia oczyszczalni ścieków lub urządzenia skali laboratoryjnej przyjmującego głównie ścieki domowe. Alternatywnym źródłem inokulum są wody powierzchniowe. Zwykle używa się od jednej kropli (0,05 ml) do 5 ml filtratu na litr podłoża; konieczne mogą być próby dla znalezienia optymalnej objętości danego wycieku (zob. I.6.4.2 i I.6.5).

VI.2.4. **Przygotowanie kolb**

Silnie napowietrzyć podłoże mineralne na co najmniej 20 min. Przeprowadzić każdą serię badań z podłożem mineralnym pochodzącym z tej samej partii. Ogólnie, podłoże jest gotowe do użycia po odstaniu 20 h, w temperaturze badania. Oznaczyć stężenie rozpuszczonego tlenu do celów kontrolnych; wartość powinna wynosić około 9 mg/litr w 20 °C. Prowadzić wszystkie przenoszenia i operacje napełniania nasyconym podłożem wolnym od pęcherzyków, na przykład poprzez użycie syfonów.

▼B

Przygotować równoległe grupy butli BOD dla oznaczeń badanej i chemicznej substancji odniesienia w równoczesnych seriach doświadczalnych. Zestawić wystarczającą liczbę butli BOD, włączając ślepe próby inokulum, wykonać co najmniej zdublowane pomiary zużycia tlenu w pożądanych odstępach badawczych, na przykład po 0, 7, 14, 21 i 28 dniach. Dla zapewnienia zdolności identyfikacji 10-dniowego okna wymagana jest większa ilość butli.

Dodać całkowicie napowietrzone podłoże mineralne do dużych butli, tak by były wypełnione w około jednej trzeciej. Następnie dodać wystarczającą ilość roztworu podstawowego badanej substancji i chemicznej substancji odniesienia do oddzielnych dużych butli tak by końcowe stężenie substancji chemicznej zwykle było niewiększe niż 10 mg/litr. Nie dodawać substancji chemicznej do podłoża kontrolnego ślepej próby zawartego w następnej dużej butli.

W celu zapewnienia, że aktywność inokulum nie jest ograniczona, stężenie rozpuszczonego tlenu nie może być poniżej 0,5 mg/litr w butli BOD. To ogranicza stężenie badanej substancji do około 2 mg/litr. Jednakże dla słabo rozpuszczalnych związków i tych o niskim ThOD można użyć 5–10 mg/litr. W kilku przypadkach jest zalecane przeprowadzenie równoległych serii badań badanej substancji o dwu różnych stężeniach na przykład, 2 i 5 mg/litr. Zwykle oblicza się ThOD na podstawie tworzenia się soli amonowych, lecz jeżeli oczekiwana lub znana jest fakt, że może zajść nitryfikacja, oblicza się go na podstawie tworzenia azotanu (ThOD-NO_3: zob. załącznik II.2). Jednakże jeśli nitryfikacja nie jest całkowita, ale zaszła, należy skorygować zmiany w stężeniu azotynu i azotanu, oznaczone analitycznie (zob. załącznik V).

Jeżeli jest do zbadania toksyczność badanej substancji (w przypadku, na przykład, gdy znaleziono wcześniejsze wartości niskiej biodegradowalności), jest konieczna inna seria butli.

Przygotować inna dużą butlę do pomieszczenia napowietrzonego podłoża mineralnego (do około jednej trzeciej jej objętości) plus badana substancja i chemiczna substancja odniesienia o końcowych stężeniach zwykle takich samych jak w tych z innych dużych butli.

Zaszczepić roztwory w dużych butlach ściekiem drugiego stopnia (jedną kroplą (0,05 ml), lub do 5 ml/litr)) lub z innego źródła, na przykład wody rzecznej (zob. I.6.4.2). Na koniec dopełnić roztwory do objętości napowietrzonym podłożem mineralnym stosując wąż wpuszczony na dno butli dla uzyskania odpowiedniego mieszania.

VI.2.5. **Liczba kolb w typowym przebiegu**

W typowym przebiegu stosuje się następujące butle:

— co najmniej 10 zawierających badaną substancję i inokulum (zawiesina badana),

— co najmniej 10 zawierających tylko inokulum (ślepa próba z inokulum),

— co najmniej 10 zawierających chemiczna substancja odniesienia i inokulum (procedura kontroli),

▼B

— i, gdy konieczne, 6 butli zawierających badaną substancję, chemiczną substancję odniesienia i inokulum (kontrola toksyczności). Jednakże dla zapewnienia zdolności identyfikacji 10-dniowego okna konieczna może być około dwukrotnie większa ilość butli.

VI.2.6. Przeprowadzenie badania

Rozdzielić przygotowany roztwór niezwłocznie do odpowiednich grup butli BOD za pomocą węża z dolnej ćwiartki (nie z dna) do odpowiednio dużych butli, tak aby wszystkie butle BOD zostały całkowicie napełnione. Postukać delikatnie, by usunąć wszystkie pęcherzyki powietrza. Analizować butle o zerowym czasie niezwłocznie na zawartość rozpuszczonego tlenu metodą Winkler lub elektrodowo. Zawartość butli może być zabezpieczona dla późniejszej analizy metodą Winklera przez dodanie siarczanu manganu (II) i wodorotlenku sodu (pierwszy odczynnik Winklera). Przechowywać w starannie zamkniętych, zawierających związany tlen jako brązowy uwodniony tlenek manganu (III), w ciemności w temperaturze 10–20 ^{o}C przez nie dłużej niż 24 godziny przed wykonaniem pozostałych kroków metody Winklera. Zakorkować pozostałe replikowane butle, upewniając się, że nie zawierają pęcherzyków powietrza, i inkubować w 20 ^{o}C w ciemności. Każdej serii musi towarzyszyć całkowita seria równoległa z zaszczepionymi podłożami ślepej próby. Wyjąć co najmniej zdublowane butle wszystkich serii w celu analizy rozpuszczonego tlenu w odstępach czasu (co najmniej cotygodniowo) przez 28 dni inkubacji.

Cotygodniowe pobieranie próbek powinno umożliwić ocenę stosunku procentowego usunięcia w 14-dniowym oknie, przy czym pobieranie próbek co 3–4 dni powinno umożliwić identyfikację 10-dniowego okna, wymaganego około podwójnie co większość butli.

Dla substancji badanych zawierających azot należy wykonać korekty poboru tlenu przez każdą zachodzącą nitryfikację. By to wykonać, użyć metody O_2-elektrody dla oznaczania stężenia rozpuszczonego tlenu i następnie pobrać próbkę z butli BOD do analizy na azotyny i azotany. Ze wzrostu stężenia azotynów i azotanów, obliczyć użyty tlen (zob. załącznik V).

VI. 3. DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

VI.3.1. **Obróbka wyników**

Wpierw obliczyć BOD użyte po każdym okresie czasu przez odejmowanie zubożenia tlenu (mg/litr) ślepej próby z inokulum od tej wykazanej przez badaną substancję. Podzielić to poprawione zubożenie przez stężenie(mg/litr) badanej substancji, aby uzyskać właściwe BOD jako mg tlenu na mg badanej substancji. Obliczyć procentową biodegradowalność przez podzielenie właściwego BOD przez właściwe ThOD (obliczonego zgodnie z załącznikiem II.2) lub COD (oznaczonego przez analizę, zob. załącznik II.3), zatem:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ pobranego przez badaną substancję} - \text{mg } O_2 \text{ pobranego wślepej próbie})}{(\text{mg badanej substancji wkolbie })}$$

▼B

= mg O_2/mg badana substancja

$$\% \text{ degradacji} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg badanej substancji})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg badanej substancji})} \times 100$$

lub

$$\% \text{ degradation} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg badanej substancji})}{\text{COD}(\text{mg } O_2/\text{mg badanej substancji})} \times 100$$

Należy zauważyć, że te dwie metody niekoniecznie dają te same wartości; korzystne jest użycie pierwszej metody.

Dla badanych substancji zawierających azot użyć odpowiednie ThOD (NH_4 lub $N0_3$) zgodnie z tym, co jest znane lub oczekiwane o występowaniu nitryfikacji (załącznik II.2). Jeżeli nitryfikacja zachodzi lecz nie jest całkowita, obliczyć poprawkę dla tlenu zużytego przez nitryfikację ze zmiany w stężeniu azotynów i azotanów (załącznik V).

VI.3.2. **Ważność wyników**

Zubożenie tlenu w ślepej próbie z inokulum nie powinno przekraczać 1,5 mg rozpuszczonego tlenu/litr po 28 dniach. Wyższe wartości wymagają prześledzenia techniki eksperymentalnej. Resztkowe stężenie tlenu w badanych butlach nie powinno nigdy spaść poniżej 0,5 mg/litr. Takie niskie poziomy tlenu są ważne, gdy stosowana metoda oznaczania rozpuszczonego tlenu jest zdolna do dokładnego pomiaru takich poziomów.

Zob. także I.5.2.

VI.3.3. **Sporządzanie sprawozdania**

Zob. I.8.

VI.4. ARKUSZ DANYCH

Przykład arkusza danych podano poniżej.

BADANIE METODĄ „ZAMKNIĘTEJ BUTLI”

1. **LABORATORIUM**

2. **DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA**

3. **SUBSTANCJA BADANA**

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: … mg/litr

Początkowe stężenie w butli: … mg/litr

ThOD lub COD: … mg O_2/mg substancji badanej

4. **INOKULUM**

Źródło:

Poddano traktowaniu:

▼B

Przygotowanie wstępne, o ile stosowano:

Stężenie w mieszaninie reakcyjnej: … mg/litr

5. **OZNACZANIE DO**

Metoda: Winklera/elektrodowa

Analizy kolb

Czas inkubacji (d)			DO mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Ślepa próba -(bez substancji chemicznej	1	C_1				
	2	C_2				
Średnia	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Badana substancja chemiczna	1	a_1				
	2	a_2				
Średnia	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Uwaga: Podobny arkusz może być stosowany dla substancji odniesienia i kontroli toksyczności.

6. **POPRAWKA DLA NITRYFIKACJI** (zob. załącznik V)

Czas inkubacji (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Stężenie azotanu (mg N/litr)				
(ii)	Zmiana w stężeniu azotanu (mg N/litr)	—			
(iii)	Równoważnik tlenu (mg/litr)	—			
(iv)	Stężenie azotynu (mg N/litr)				
(v)	Zmiana w stężeniu azotynu (mg N/litr)	—			
(vi)	Równoważnik tlenu (mg/litr)	—			
(iii + vi)	Całkowity równoważnik tlenu (mg/litr)	—			

7. **ZUBOŻENIE DO: % DEGRADACJA**

	Zubożenie po n dniach (mg/litr)			
	n_1	n_2	n_3	
KOLBA 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
KOLBA 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Zubożenie po n dniach (mg/litr)			
	n_1	n_2	n_3	
KOLBA 1: $\%D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{stężenie badane} \times \text{ThOD substancji chemicznej}}$				
KOLBA 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{stężenie badane} \times \text{ThOD substancji chemicznej}}$				
$\%\ D\ \text{średnia}\ (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Nie brać średniej jeżeli jest znacząca różnica pomiędzy replikami.

m_{to} = wartość w badanej kolbie w czasie 0

m_{tx} = wartość w badanej kolbie w czasie x

m_{bo} = średnia wartość ślepej próby w czasie 0

m_{bx} = średnia wartość ślepej próby w czasie x

Zastosować także poprawkę dla nitryfikacji z (iii + vi) w sekcji 6.

8. **ZUBOŻENIA DO W ŚLEPYCH PRÓBACH**

Zużycie tlenu przez ślepą próbę: ($m_{bo} - m_{b28}$) mg/litr. Niniejsze zużycie jest istotne dla ważności naukowej badania. Powinno być mniejsze niż 1,5 mg/litr.

CZĘŚĆ VII. **BADANIE M.I.T.I.** (Metoda C.4-F)

VII.1. ZASADA METODY

Pobieranie tlenu trakcie mieszania roztworu lub zawiesiny badanej substancji w podłożu mineralnym, zaszczepionego specjalnie hodowanymi, nieadoptowanymi drobnoustrojami, jest mierzone automatycznie w ciągu okresu 28 dni w zaciemnionym, zamkniętym respirometrze w 25 ± 1 °C. Wydzielany ditlenek węgla jest absorbowany przez wapno sodowane. Biodegradowalność jest wyrażana jako procent pobieranego tlenu (skorygowany dla poboru w ślepej próbie) poboru teoretycznego (ThOD). Procent pierwotnej biodegradowalności jest również obliczany z dodatkowej właściwej analizy chemicznej wykonywanej na początku i pod koniec inkubacji oraz, alternatywnie, przez analizę DOC.

VII.2. OPIS METODY

VII.2.1. **Przyrząd**

a) Automatyczny elektrolityczny miernik BOD respirometr zwykle wyposażony w 6 butli, każda 300 ml i zaopatrzony w kubki na substancję absorbującą CO_2.

▼B

b) Stała temperatura pokojowa i/lub łaźnia wodna 25 °C ± 1 °C lub lepszej.

c) Zespół filtracji membranowej (alternatywny).

d) Analizator węgla (alternatywny).

VII.2.2. **Przygotowanie podłoża mineralnego**

Przygotować następujące roztwory podstawowe, stosując odczynniki czystości analitycznej i wodę (I.6.1.):

a)	Diwodoroortofosforan potasu, KH_2P0_4	8,50 g
	monowodoroortofosforan dipotasu, K_2HP0_4	21,75 g
	monowodoroortofosforan disodu, dodekawodny Na_2HP0_4 12 H_20	44,60 g
	chlorek amonu, NH_4Cl	1,70 g
	Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra.	
	Wartośc pH roztworu powinna wynosić 7,2.	
b)	Siarczan magnezu, heptawodny $MgSO_4$ 7 H_20	22,50 g
	Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra.	
c)	Chlorek wapnia bezwodny, $CaCl_2$	27,50 g
	Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra.	
d)	Chlorek żelaza (III), heksawodny $FeCl_3$ 6 H_20	27,50 g
	Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra.	

Pobrać 3 ml każdego roztworu (a), (b), (c) i (d) i dopełnić do 1 litra.

VII.2.3. **Przygotowanie inokulum**

Zebrać świeże próbki z nie więcej niż dziesięciu miejsc, głównie z obszarów, gdzie stosowana i unieszkodliwiana jest duża rozmaitość substancji chemicznych. Z takich miejsc, jak oczyszczalnie ścieków, oczyszczalnie ścieków wodnych przemysłowych, rzek, jezior, mórz, zebrać 1 litrowe próbki osadu, gleby powierzchniowej, wody itp. i dokładnie wymieszać. Po usunięciu ciał znajdujących się na powierzchni i odstawieniu ustawić pH nadsączu na 7 ± 1 za pomocą wodorotlenku sodu lub kwasu fosforowego.

Użyć odpowiednią objętość odfiltrowanego nadsączu napełnienia zbiornika, służącego do napełniania i wylewania aktywowanego osadu, i napowietrzać roztwór około 23 1/2 godziny. Trzydzieści minut po wstrzymaniu napowietrzania odrzucić około jednej trzeciej całej objętości nadsączu i dodać równą objętość roztworu (pH 7) zawierającego po 0,1 % glukozy, peptonu i ortofosforanu potasu w celu zsedymentowania materiału i rozpocząć ponowne napowietrzanie. Powtarzać niniejszą procedurę raz dziennie. Zbiornik z osadem należy obsługiwać zgodnie z dobrą praktyką: ciecz musi być klarowna, temperaturę należy utrzymywać w 25 ± 2 °C, pH powinno wynosić 7 ± 1, osad należy prawidłowo osadzać, należy utrzymywać wystarczające napowietrzanie mieszaniny aerobowej przez cały czas, powinny być obecne pierwotniaki a aktywność osadu należy badać względem substancji odniesienia co najmniej raz na trzy miesiące. Nie używać osadu jako inokulum, przed upływem co najmniej miesiąca jego utrzymywania i po okresie dłuższym od czterech miesięcy. Następnie pobierać próbki z co najmniej 10 miejsc w regularnych odstępach czasu, raz na trzy miesiące.

▼B

W celu utrzymania świeżego i starego osadu w tej samej aktywności zmieszać odfiltrowany nadsącz aktywowanego bieżąco używanego osadu z równą objętością odfiltrowanego nadsączu z mieszaniny zebranej z dziesięciu źródeł i prowadzić kulturę połączonej cieczy, jak powyżej. Pobrać osad do użycia jako inokulum 18–24 godzin po zasileniu zbiornika.

VII.2.4. **Przygotowanie kolb**

Przygotować następujące sześć kolb:

Nr 1: badana substancja w wodzie rozcieńczającej w 100 mg/l

Nr 2, 3 i 4: badana substancja w podłożu mineralnym w 100 mg/l

Nr 5: chemiczna substancja odniesienia (np. anilina) w podłożu mineralnym w 100 mg/l

Nr 6: tylko podłoże mineralne

Dodać słabo rozpuszczalną badaną substancję bezpośrednio na podstawie wagi lub objętości lub postępować jak opisano w załączniku III, poza przypadkiem, gdy nie należy używać ani rozpuszczalników, ani środków emulsyfikujących. Dodać absorbent CO_2 do wszystkich kolb w przygotowanych specjalnych kubkach. Ustawić pH w kolbach nr 2, 3 i 4 na 7,0.

VII.2.5. **Przeprowadzenie badania**

Zaszczepić kolby nr 2, 3 i 4 (zawiesina badana), nr 5 (kontrola aktywności) i nr 6 (inokulum ślepa próba) małą objętością inokulum, by uzyskać stężenie 30 mg/l zawiesiny ciał stałych. Niedodawane jest inokulum do kolby nr 1, która służy jako kontrola abiotyczna. Zestawić wyposażenie, sprawdzić szczelność, włączyć mieszadła, i rozpocząć pomiar pobierania tlenu w warunkach ciemności. Codziennie sprawdzać temperaturę, mieszadła i rejestrator kulometrycznego pobierania tlenu, notować wszystkie zmiany w kolorze zawartości kolb. Bezpośrednio odczytywać pobieranie tlenu w sześciu kolbach odpowiednią metodą, na przykład z sześciopunktowego rejestratora drukującego krzywe BOD. Na koniec inkubacji, zwykle 28 dni, zmierzyć pH zawartości kolb i oznaczyć stężenie pozostałości badanej substancji i wszystkich pośrednich, a w przypadku substancji rozpuszczalnych w wodzie, stężenie DOC (załącznik II.4). Zwrócić szczególną uwagę w przypadku lotnych substancji chemicznych. Jeżeli przewidywana jest nitryfikacja, oznaczyć jeżeli możliwe, stężenie azotynów i azotanów.

VII. 3. DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

VII.3.1. **Obróbka wyników**

Podzielić ilość pobranego tlenu (mg) przez badaną substancję po danym czasie (skorygować o wartość pobraną w ślepej próbie kontroli inokulum po tym samym czasie), przez wagę użytej badanej substancji. Daje to BOD wyrażone jako mg tlenu/mg badana substancja, czyli:

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg } O_2 \text{ probranego przez badaną substancję} - \text{mg } O_2 \text{ probranego wślepej próbie}}{\text{mg badanej substancji wkolbie}}$$

= mg 0_2/mg badana substancja.

▼B

Procentowa biodegradacja jest zatem otrzymywana z:

$$\%\ \text{biodegradacji} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg substancji})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg substancji})} \times 100$$

Dla mieszanin obliczyć ThOD z analizy składników jak dla pojedynczych związków. Użyć odpowiednie ThOD ($ThOD_{NH4}$ lub $ThOD_{N03}$) w zależności, czy nitryfikacja jest obecna czy ukończona (załącznik II.2). Jeżeli jednakże nitryfikacja zachodzi, ale nie jest całkowita, wykonać poprawkę dla tlenu zużytego w nitryfikacji, wyliczonego ze zmian stężeń azotynów i azotanów (załącznik V).

Obliczyć procentową pierwotna biodegradację ze straty właściwej macierzystej substancji chemicznej (zob. 1.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Jeżeli zaszła strata badanej substancji w kolbie nr 1 mierzącej fizyko-chemiczne usunięcie, zarejestrować to i użyć stężenia badanej substancji (S_b) po 28 dniach w tej kolbie dla obliczenia procentowej biodegradacji.

Jeżeli wykonano oznaczenia DOC (alternatywne), obliczyć ostateczną procentową biodegradację z:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

jak opisano w pkt 1.7.1. Jeśli nie wystąpiła strata DOC w kolbie nr 1, mierzącej fizyko-chemiczne usunięcie, użyć stężenia DOC w niniejsze kolbie do obliczenia procentowej biodegradacji.

Zapisać wszystkie wyniki na dołączonych arkuszach danych.

VII.3.2. **Ważność wyników**

Pobieranie tlenu w ślepej próbie z inokulum jest zwykle 20–30 mg O_2/l i powinno być nie większe niż 60 mg/l w ciągu 28 dni. Wartości wyższe od 60 mg/l wymagają krytycznego sprawdzenia danych i technik eksperymentalnych. Jeżeli wartość pH jest poza zakresem 6–8,5, a zużycie tlenu przez badaną substancję jest mniejsze niż 60 %, należy powtórzyć badanie z niższym stężeniem badanej substancji.

Zob. także I.5.2.

Jeżeli procentowa degradacja aniliny obliczona ze zużycia tlenu nie przekracza 40 % po 7 dniach i 65 % po 14 dniach, badanie uważane jest za nieważne.

VII.3.3. **Sporządzanie sprawozdania**

Zob.: I.8.

VII.4. ARKUSZ DANYCH

Przykład arkusza danych podano poniżej.

BADANIE MITI (I)

1. **LABORATORIUM**

2. **DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA**

▼B

3. **SUBSTANCJA BADANA**

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: … mg/l jako substancja chemiczna

Początkowe stężenie w podłożu, C_O: … mg/l jako substancja chemiczna

Objętość mieszaniny reakcyjnej, V: … ml

ThOD: … mg O_2/l

4. **INOKULUM**

Miejsca pobierania osadu kanalizacyjnego:

1) … 6) …

2) … 7) …

3) … 8) …

4) … 9) …

5) … 10) …

Stężenie zawiesiny ciał stałych w aktywowanym osadzie po sezonowaniu z syntetycznym ściekiem = ... mg/l

Objętość aktywowanego osad na litr końcowego podłoża = ... ml

Stężenie osad końcowym podłożu = ... mg/l

5. **POBÓR TLENU: BIODEGRADOWALNOŚĆ**

Typ używanego respirometru:

			Czas (dni)				
			0	7	14	21	28
O_2 pobrany (mg) badana substancja	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 pobrany (mg) ślepa proba	b						
Poprawka pobranego O_2 (mg)	(a_1-b) (a_2-b) (a_3-b)						
BOD na mg badanej substancji	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Kolba 1					
		Kolba 2					
		Kolba 3					
% degradacja $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		srednia (*)					

(*) Nie uśredniać przy znacznych różnicach pomiędzy replikami.

▼B

Uwaga: podobny arkusz można używać dla substancji odniesienia.

6. **ANALIZA WĘGLA** (alternatywna)

Analizator węgla:

Kolba	DOC				% DOC usunięte	Średnia
	zmierzone		skorygowane			
Woda + substancja badana	a				—	—
Osad + substancja badana	b_1		b_1-c			
Osad + substancja badana	b_2		b_2-c			
Osad + substancja badana	b_3		b_3-c			
Ślepa próba kontrolna	c		—		—	—

$$\text{DOC\% usunięty} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **WŁAŚCIWE CHEMICZNE DANE ANALITYCZNE**

	Pozostałość badanej substancji na koniec badania	% degradacja
ślepa próba z wodą	S_b	
zaszczepione podłoze	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\%\text{degradacja} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Obliczyć % degradacji odpowiednio dla kolby a_l i a_3

8. **UWAGI**

Należy dołączyć, gdy dostępna, krzywą BOD w zależności od czasu.

▼B

ZAŁĄCZNIK I

SKRÓTY I DEFINICJE

DO: Rozpuszczony tlen (mg/l) jest stężeniem tlenu rozpuszczonego w wodnej próbce.

BOD: Zapotrzebowanie biochemiczne na tlen (g) jest ilością tlenu zużytego przez drobnoustroje metabolizujące badany związek; także wyrażane jako gramy pobieranego tlenu na gramy badanego związku (zob. metoda C.5).

COD: Zapotrzebowanie chemiczne na tlen (g) jest ilością tlenu zużytego w czasie trwania utleniania badanego związku gorącym zakwaszonym dichromianem; dostarcza pomiaru ilości obecnych utlenialnych ciał; także wyrażane jako gramy tlenu zużytego na gramy badanego związku (zob. metoda C.6).

DOC: Rozpuszczalny węgiel organiczny jest to węgiel organiczny obecny w roztworze, lub ten przechodzący przez filtr 0,45 mikrona lub pozostaje w nadsączu po odwirowaniu przy 40 000 m/s^2 (± 4 000 g) dla 15 min.

ThOD: Teoretyczne zapotrzebowanie na tlen (mg) jest całkowitą ilością tlenu wymaganą do całkowitego chemicznego utlenienia; jest obliczane ze wzoru cząsteczkowego (zob. załącznik II.2) i jest także wyrażane jako mg wymaganego tlenu na mg badanego związku.

$ThCO_2$: Teoretyczny ditlenek węgla (mg) jest ilością ditlenku węgla obliczoną jako wytworzoną ze znanej lub zmierzonej zawartości węgla związku badanego, przy pełnej mineralizacji; także wyrażany jako ilość mg ditlenku węgla wydzielanego na mg badanego związku.

TOC: Całkowity węgiel organiczny próbki jest sumą węgla organicznego w roztworze i w zawiesinie.

IC: Węgiel nieorganiczny.

TC: Całkowity węgiel, jest sumą węgla organicznego i nieorganicznego obecną w próbce.

Pierwotna biodegradacja:

jest zmianą w chemicznej strukturze substancji, spowodowaną działaniem biologicznym, powodującą utratę specyficznych właściwości tej substancji.

Ostateczna biodegradacja (aerobowa):

jest uzyskanym poziomem degradacji, gdy badany związek zostaje całkowicie rozłożony przez drobnoustroje, objawiający się wytwarzaniem ditlenku węgla, wody, soli mineralnych i nowych mikrobowych składowych komórkowych (biomasy).

Łatwo biodegradowalne:

umowna klasyfikacja substancji chemicznych przechodzących pewne specyficzne badania przesiewowe na ostateczną biodegradowalność; te badania są tak zaostrzone, że można stwierdzić, że takie związki ulegną szybko i całkowicie biodegradacji w środowiskach wodnych w warunkach aerobowych.

▼B

Pierwotnie biodegradowalny:

klasyfikacja substancji chemicznych dla których istnieją niedwuznaczne dowody biodegradacji (pierwotnej lub ostatecznej) we wszystkich naukowo uznanych badaniach biodegradowalności.

Podatność na obróbkę:

jest uległością związków do usuwania w czasie trwania biologicznej obróbki ścieków bez zakłócania zwykłego działania procesów przetwarzania. Ogólnie łatwo biodegradowalne związki są podatne na obróbkę, lecz nie wszystkie o pierwotnej biodegradowalności. Abiotyczne procesy mogą także powodować działanie.

Czas opóźnienia:

jest czasem od inokulacji, w badaniu „die-away", do momentu aż procent degradacji wzrośnie co najmniej 10 %. Czas opóźnienia jest często bardzo zmienny i słabo odtwarzalny:

Czas degradacji:

jest czasem od końca czasu opóźnienia do czasu uzyskania 90 % maksymalnego poziomu degradacji.

10- dniowe okno:

jest 10 dniami bezpośrednio następującymi po osiągnięciu 10 % degradacji.

▼B

ZAŁĄCZNIK II

OBLICZENIE I OZNACZENIE ODPOWIEDNICH PARAMETRÓW PODSUMOWUJĄCYCH

W zależności od wybranej metody, mogą być wymagane pewne parametry podsumowujące. Następująca sekcja opisuje wyprowadzenie tych wartości. Użycie tych parametrów jest opisane w poszczególnych metodach.

1. **Zawartość węgla**

Zawartość węgla jest obliczana ze znanego składu pierwiastkowego lub oznaczana poprzez analizę pierwiastkową substancji badanej.

2. **Teoretyczne zapotrzebowanie tlenu (ThOD)**

Teoretyczne zapotrzebowanie tlenu (ThOD) może być obliczone, jeżeli znany jest skład pierwiastkowy lub jest wyznaczony przez analizę elementarną. Dla związku:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

lub z nitryfikacją,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2(h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

bez nitryfikacji,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2(h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Zapotrzebowanie chemiczne na tlen (COD)**

Zapotrzebowanie chemiczne na tlen (COD) jest oznaczane zgodnie z metodą C.6.

4. **Rozpuszczalny węgiel organiczny (DOC)**

Rozpuszczalny węgiel organiczny (DOC) jest według definicji węglem organicznym wszystkich substancji chemicznych i mieszanin w wodzie przechodzących przez filtr 0,45 mikrona.

Próbki z naczyń badawczych są pobierane i niezwłocznie filtrowane w aparacie filtracyjnym, stosując odpowiedni filtr membranowy. Pierwsze 20 ml (można zmniejszyć ilość, stosując mniejsze filtry) filtratu jest odrzucane. Objętości 10–20 ml lub mniej, jeżeli wstrzykuje się (objętość zależy od ilości wymaganej dla analizatora węgla), są poddawane analizie na węgiel. Stężenie DOC jest oznaczane za pomocą analizatora węgla organicznego zdolnego do dokładnych pomiarów stężenia węgla równoważnego lub niższego niż 10 % początkowego stężenia DOC użytego w badaniu.

Odfiltrowane próbki, które nie mogą być analizowane tego samego dnia, można zabezpieczyć przez przechowanie w lodówce w 2–4 °C przez 48 godz. lub niższej - 18 °C przez dłuższy czas.

Uwagi;

Filtry membranowe są często impregnowane środkami powierzchniowoczynnymi w celu hydrofilizacji. Zatem filtr może zawierać do kilku mg rozpuszczalnego węgla organicznego, który będzie zakłócał oznaczenia biodegradowalności. Usuwa się związki powierzchniowoczynne i inne rozpuszczalne związki organiczne z filtrów przez gotowanie ich w wodzie dejonizowanej przez trzy okresy czasu po jednej godzinie każdy. Filtry następnie można przechowywać w wodzie przez tydzień. Jeżeli wkłady filtrów jednorazowych są używane, każda partia musi być sprawdzona dla potwierdzenia ze nie zawiera rozpuszczalnego węgla organicznego.

▼B

W zależności od rodzaju filtra membranowego badana substancja może być zatrzymywana przez adsorpcję. Jest zatem godne polecenia upewnienie się czy badana substancja nie jest zatrzymywana przez filtr.

Odwirowanie w 40 000 m/sec^2 (4 000 g) przez 15 min można stosować do zróżnicowania TOC względem DOC zamiast filtracji. Metoda nie jest pewna przy początkowym stężeniu < 10 mg DOC/l ponieważ, albo nie wszystkie bakterie są usuwane, albo węgiel jako składnik plazmy bakteryjnej jest ponownie rozpuszczany.

BIBLIOGRAFIA

— 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 38409 Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammunter-suchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut fur Normung e.V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), 169.

▼B

ZAŁĄCZNIK III

OCENA BIODEGRADOWALNOŚCI SŁABO ROZPUSZCZALNYCH SUBSTANCJI

W badaniach biodegradowalności słabo rozpuszczalnych substancji należy zwrócić szczególną uwagę na następujące aspekty.

Podczas gdy jednorodne ciecze rzadko stwarzają problemy z pobieraniem ich próbek, dla materiałów w postaci ciał stałych, zalecana jest ich homogenizacja odpowiednimi metodami, aby zapobiec błędom z powodu ich niejednorodności. Należy zwrócić szczególną uwagę, gdy wymagane są reprezentatywne próbki kilkumiligramowe z mieszanin substancji chemicznych o dużej zawartości zanieczyszczeń.

W czasie badań można stosować różne formy mieszania. Należy zwrócić uwagę by używać dostatecznego mieszania tylko do utrzymania substancji chemicznej w postaci zawiesiny, w celu zapobieżenia przegrzaniu, nadmiernemu pienieniu i nadmiernym siłom poprzecznym.

Można stosować emulsyfikator dający stabilną zawiesinę substancji chemicznej. Nie może być on toksyczny dla bakterii i ulegać biodegradacji lub powodować pienienie w warunkach badania.

Do rozpuszczalników stosuje się takie same kryteria jak do emulsyfikatorów.

Nie jest zalecane używanie stałych nośników przy badaniu stałych substancji ale mogą być one odpowiednie dla substancji oleistych.

Gdy stosowane są pomocnicze substancje, takie jak emulsyfikatory, rozpuszczalniki oraz nośniki, należy przeprowadzić ślepą próbę z substancją pomocniczą.

Każde z trzech badań respirometrycznych CO_2, BOD, MITI można użyć w badaniach biodegradowalności związków słabo rozpuszczalnych.

BIOBLIGRAFIA

— de Morsier, A. et al., Biodegradacja tests for słabo rozpuszczalne compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

— Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

▼B

ZAŁĄCZNIK IV

OCENA BIODEGRADOWALNOŚCI SUBSTANCJI CHEMICZNEJ PODEJRZEWANEJ O DZIAŁANIE TOKSYCZNE DLA INOKULUM

Jeżeli substancja chemiczna podlegająca badaniu na łatwość biodegradowalności okazuje sie być niebiodegradowalną, zalecana jest następująca procedura, jeśli pożądana jest różnica pomiędzy inhibicją a obojętnością (Reynolds et al., 1987).

Do badań biodegradacji i toksyczności należy użyć podobnych lub identycznych inokulum.

Do oceny toksyczności substancji chemicznych w badaniach łatwości biodegradacji wydaje się odpowiednie zastosowanie jednego z, lub połączonych badań: inhibicji szybkości respiracji aktywowanego osadu (Dir 88/302/EEC), BOD i/lub inhibicji wzrostu.

Aby zapobiec inhibicji z powodu toksyczności, sugeruje się, aby stężenia substancji badanej, stosowane w badaniach łatwości biodegradowalności, były mniejsze niż 1/10 wartości EC_{50} (lub mniejsze niż wartości EC_{20}) otrzymywanych w badaniach toksyczności. Związki o wartości EC_{50} większej niż 300 mg/l nie wywierają prawdopodobnie działania toksycznego w badaniach łatwości biodegradacji.

Wartości EC_{50} mniejsze niż 20 mg/l prawdopodobnie stwarzają poważne problemy w następnych badaniach. Należy zastosować niskie stężenia badania, powodującego konieczność użycia surowego i czułego badania „zamkniętej butli" lub użycia znacznika ^{14}C. Alternatywnie sezonowane inokulum pozwala użyć wyższego stężenia substancji badanej. W ostatnim przypadku gubi się jednak kryterium właściwe badaniu łatwości biodegradacji.

BIOBLIGRAFIA

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

▼B

ZAŁĄCZNIK V

KOREKCJA POBORU TLENU Z POWODU ZAKŁÓCENIA PRZEZ NITRYFIKACJĘ

Błędy z powodu nieuwzględniania nitryfikacji w ocenie pobieranie tlenu w biodegradowalności substancji badanych niezawierających azotu są marginalne (nie większe niż 5 %), nawet jeżeli utlenianie azotu amonowego w podłożu zachodzi inaczej niż pomiędzy substancją badaną i naczyniami ślepej próby. Jednakże zawarty w badanych substancjach azot powoduje powstanie poważnych błędów.

Jeżeli zaszła nitryfikacja lecz nie jest całkowita, obserwowane pobieranie tlenu przez mieszaninę reakcyjną musi być skorygowane o ilość tlenu zużytego przy utlenieniu amoniaku do azotynów i azotanów; jeżeli zmiany w stężeniu, w czasie trwania inkubacji, azotynów i azotanów są określone następującymi równaniami:

$$2\ NH4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

ogólnie:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (3)$$

Według równania (1) pobór tlenu przez 28 g azotu zawartego w chlorku amonu (NH4Cl) utlenianego do azotynu wyniesie 96 g, dając wskaźnik 3,43 (96/28). W ten sam sposób z równania (3) pobór tlenu przez 28 g azotu utlenionego do azotanu wynosi 28 g, dając wskaźnik 4,57 (128/28).

Ponieważ reakcje zachodzą sekwencyjnie, zostały przeprowadzone przez różne szczepy bakterii, jest możliwy wzrost lub spadek stężenia azotynów; w ostatnim przypadku utworzy się równoważne stężenie azotanów, Zatem tlen zużyty w utworzeniu azotanu jest 4,57 mnożony przez wzrost w stężeniu azotanu, podczas gdy tlen połączony z utworzeniem azotynu jest 3,43 pomnożony przez wzrost w stężeniu azotynu lub ze spadkiem w jego stężeniu strata tlenu jest - 3,43 pomnożona przez spadek w stężeniu.

Oznacza to:

O_2 zużytego w tworzeniu azotanu = 4,57 x wzrost w stężeniu azotanu (4)

i

O_2 zużytego w tworzeniu azotynu = 3,43 x wzrost w stężeniu azotynu (5)

i

Strata O_2 w zaniku azotynu = - 3,43 x spadek w stężeniu azotanu (6)

Tak więc

Pobór O_2 z powodu nitryfikacji = ± 3,43 x zmiana stężenia azotynu + 4,57 x wzrost stężenia azotanu. (7)

I dlatego

Pobór O_2 z powodu utleniania C = całkowity obserwowany pobór – pobór z powodu nitryfikacji (8)

Alternatywnie, jeżeli tylko całkowity utleniony azot jest oznaczony, pobieranie tlenu z powodu nitryfikacji, może być wzięte, w pierwszym przybliżeniu, 4,57 x wzrost w utlenionym azocie.

Wartość poprawki zużycia tlenu z powodu utleniania węgla jest następnie porównywana z ThOD NH_3, jak wyliczono w załączniku II.

▼B

C.5. DEGRADACJA – ZAPOTRZEBOWANIE BIOCHEMICZNE NA TLEN

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Celem metody jest pomiar zapotrzebowania biochemicznego na tlen (BOD) substancji organicznych w stanie ciekłym lub stałym.

Dane wypracowane w niniejszym badaniu odnoszą się do związków rozpuszczalnych w wodzie, jednakże związki lotne oraz te o niskiej rozpuszczalności w wodzie, mogą być również, przynajmniej z zasady badane.

Metoda jest stosowana tylko do tych badanych materiałów organicznych, które nie są inhibitorami w stosunku do bakterii w stężeniach używanych w badaniu. Jeżeli badany materiał nie jest rozpuszczalny w stężeniu badania, należy użyć specjalnych środków, takich jak użycie ultradźwięków, dla uzyskania dobrej zawiesiny badanego materiału.

Informacje na temat toksyczności substancji chemicznej są użyteczne do interpretacji niskich wyników i do wyboru odpowiednich stężeń badań.

1.2. DEFINICJA I JEDNOSTKI

BOD jest zdefiniowane jako masa rozpuszczonego tlenu pożądana przez właściwą objętość roztworu substancji dla procesu utleniania biochemicznego w opisanych warunkach.

Wyniki są wyrażane jako gramy BOD na gram badanej substancji.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Pożądane jest użycie odpowiednich substancji odniesienia dla sprawdzenia aktywności inokulum.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Wstępnie oznaczona ilość substancji, rozpuszczona lub zawieszona w dobrze napowietrzanym odpowiednim podłożu, jest zaszczepiana drobnoustrojami i inkubowana w stałej zdefiniowanej temperaturze otoczenia w ciemności.

BOD jest oznaczane przez różnicę w zawartości rozpuszczonego tlenu na początku i na końcu badania. Czas trwania badania wynosi co najmniej 5 dni i nie więcej niż 28 dni.

Ślepa próba musi być oznaczona w równoległym badaniu niezawierającym badanej substancji.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Oznaczenie BOD nie może być uważane jako mające ważność naukową oznaczenie biodegradowalności substancji, a jedynie jako badanie przesiewowe (sortujące).

1.6. OPIS METODY BADANIA

Wstępny roztwór lub zawiesina substancji jest przygotowywana aby uzyskac stężenie BOD odpowiednie dla zastosowanej metody. Następnie BOD jest oznaczane stosując jedną z odpowiednich narodowo i międzynarodowo standaryzowanych metod.

▼B

2. **DANE I OCENA**

BOD zawarte w wstępnym roztworze jest obliczane zgodnie z wybraną znormalizowana metodą i przeliczane na gramy BOD na gram badanej substancji.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Metoda stosowana musi być ustalona.

Zapotrzebowanie biochemiczne na tlen należy uśrednić z co najmniej trzech ważnych pomiarów.

Wszystkie informacje i uwagi odnośnie interpretacji wyników musza być przedstawione w sprawozdaniu, szczególnie w odniesieniu do zanieczyszczeń, postaci fizycznej, działania toksycznego i właściwości związanych z budową substancją które powodują wpływ na wyniki.

Musi być wykazane w sprawozdaniu użycie dodatków hamujących biologiczna nitryfikację.

4. LITERATURA

Wykaz standaryzowanych metod, dla przykładu:

NF T 90-103: Determination biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: 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. **DEGRADACJA – ZAPOTRZEBOWANIE CHEMICZNE NA TLEN**

1. **METODA**

1.1. WPROWADZENIE

Celem metody jest pomiar zapotrzebowania chemicznego na tlen (COD) substancji organicznych w stanie ciekłym lub stałym w standardowy arbitralny sposób, w ustalonych warunkach laboratoryjnych.

Informacje na temat wzoru chemicznego są użyteczne dla prowadzenia tego badania oraz interpretacji uzyskanych wyników (np. sole halogenowe, sole żelazowe związków organicznych, związki chloroorganiczne).

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Zapotrzebowanie chemiczne na tlen jest zmierzoną utlenialnością substancji, wyrażoną jako równoważna ilość tlenu odczynnika utleniającego zużytego przez substancje w ustalonych warunkach laboratoryjnych.

Wynik jest wyrażany w gramach COD na gram badanej substancji.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Wstępnie oznaczona ilość substancji, rozpuszczonej lub zawieszonej w wodzie, jest utleniana przez dichromian potasu w stężonym kwasie siarkowym z siarczanem srebra jako katalizatorem, pod chłodnicą zwrotną przez dwie godziny. Pozostałość dichromiany jest oznaczana miareczkowo mianowanym roztworem siarczanu żelazoamonowego.

W przypadku substancji zawierających chlor, dodaje się siarczanu rtęci ([1]) celem zmniejszenia zakłócenia przez chlorki.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Z powodu arbitralnego sposobu oznaczenia, COD jest „wskaźnikiem utlenialności” i jako taki używany jest jako praktyczna metoda pomiaru związków organicznych.

Chlorki zakłócają to badanie; redukujące środki nieorganiczne lub utleniające mogą także powodować zakłócenia w oznaczaniu COD.

Niektóre związki cykliczne i wiele substancji lotnych (np. niższe kwasy tłuszczowe) nie są w pełni utleniane w niniejszym badaniu.

1.6. OPIS METODY BADANIA

Wstępny roztwór lub zawiesina substancji jest tak przygotowywana by uzyskać COD pomiędzy 250 i 600 mg na litr.

([1]) Po użyciu roztwory zawierające sole rtęci należy unieszkodliwić, by zapobiec przeniesieniu rtęci do środowiska naturalnego.

▼B

Uwagi:

W przypadku słabo rozpuszczalnych i niedających się zdyspergować substancji należy ilość drobno sproszkowanej substancji, odpowiadającej około 5 mg COD, odważyć i umieścić w aparacie doświadczalnym wraz z wodą.

Zapotrzebowanie chemiczne na tlen (COD) jest często i szczególnie w przypadku słaborozpuszczalnych substancji oznaczane korzystnie w odmianach metody, to jest w zamkniętym systemie z ciśnieniowym ekwalizerem (H. Kelkenberg, 1975). W niniejszej modyfikacji związki, które tylko z trudnością można oznaczyć metodą konwencjonalną – na przykład kwas octowy – są często z powodzeniem oznaczane. Metoda także zawodzi, jak w przypadku pirydyny. Jeżeli stężenie dichromianu potasu, jak opisano w pozycji bibliograficznej (1), wzrośnie do 0,25 N (0,0416 M), bezpośrednia doważka 5–10 mg substancji ułatwia oznaczenie COD, co jest zasadnicze dla słabo rozpuszczalnych w wodzie substancji (poz. lit. (2)).

Z drugiej strony, COD jest oznaczane, wykorzystując wszystkie odpowiednie krajowe i międzynarodowe standaryzowane metody.

2. **DANE I OCENA**

COD zawarte w kolbie doświadczalnej jest obliczane, stosując wybrane znormalizowane metody i przeliczane na gramy COD na gram badanej substancji.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Zastosowana metoda odniesienia musi być ustalona.

Zapotrzebowanie chemiczne na tlen musi być średnią co najmniej z trzech pomiarów. Wszystkie informacje i uwagi odnośnie interpretacji wyników musza być przedstawione w sprawozdaniu, szczególnie w odniesieniu do zanieczyszczeń, postaci fizycznej, i właściwości związanych z budową substancji, które powodują wpływ na wyniki.

W sprawozdaniu należy przedstawić również fakt użycia siarczanu rtęci dla zminimalizowania zakłóceń pochodzących od chlorków.

4. **LITERATURA**

(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.

Wykaz standaryzowanych metod, dla przykładu:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN 0 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NFT 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 litr.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. **ROZKŁAD – ROZKŁAD ABIOTYCZNY: HYDROLIZA JAKO FUNKCJA PH**

1. **METODA**

Niniejsza metoda badania jest równoważna metodzie OECD TG 111 (2004).

1.1. WSTĘP

Związki chemiczne mogą przedostawać się do wód powierzchniowych takimi drogami, jak: bezpośrednie stosowanie, rozpylenie poza teren upraw, odpływ, odprowadzanie wód powierzchniowych, usuwanie odpadów, ścieki przemysłowe, komunalne lub rolnicze oraz opady atmosferyczne. Związki te mogą ulegać przemianom w tych wodach w procesach chemicznych (np. hydroliza, utlenianie), fotochemicznych i/lub mikrobiologicznych. Niniejsze wytyczne opisują metodę badania laboratoryjnego mającą ocenić abiotyczne przemiany hydrolityczne związków chemicznych w układach wodnych, przy wartościach pH normalnie występujących w środowisku naturalnym (pH = 4–9) i oparte są na istniejących wytycznych (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Próby wykonuje się dla określenia: (i) szybkości hydrolizy substancji badanej w funkcji pH; oraz (ii) tożsamości lub charakteru oraz szybkości powstawania i zaniku produktów hydrolizy, na działanie których organizmy mogą być narażone. Badania takie mogą być wymagane dla związków chemicznych, które są bezpośrednio stosowane w wodzie albo które prawdopodobnie mogą się przedostawać do środowiska innymi drogami, które opisano powyżej.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Zob. załącznik 2.

1.3. ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda ta dotyczy ogólnie substancji chemicznych (znaczonych lub nieznaczonych), dla których istnieje metoda analityczna mająca wystarczającą dokładność i czułość. Ma ona zastosowanie dla związków o niskiej lotności oraz nielotnych, o wystarczającej rozpuszczalności w wodzie. Badania nie należy przeprowadzać dla związków chemicznych, które wykazują wysoką lotność ze środowiska wodnego (np. fumiganty, rozpuszczalniki organiczne) i tym samym nie można ich utrzymać w roztworze w warunkach tego badania. Badanie może być trudne do wykonania dla substancji o minimalnej rozpuszczalności w wodzie (8).

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Sterylne wodne roztwory buforowe o różnych wartościach pH (pH = 4, 7 i 9) poddaje się działaniu substancji badanej oraz inkubacji w ciemności w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych (w stałych temperaturach). Po odpowiednich okresach czasu roztwory buforowe analizuje się na obecność substancji badanej i produktów hydrolizy. W przypadku substancji znaczonej (np. ^{14}C) bilans masowy może być łatwiejszy do ustalenia.

Niniejszą metodę badania określa się jako „podejście poziomowe”, które pokazano oraz wyjaśniono w załączniku 1. Każdy „poziom” jest uruchamiany przez wyniki poprzedniego „poziomu”.

▼B

1.5. INFORMACJA O SUBSTANCJI BADANEJ

Do pomiaru szybkości hydrolizy można użyć substancji nieznaczonych albo znaczonych. Materiał znaczony jest zasadniczo preferowany przy badaniu przebiegu hydrolizy oraz przy ustalaniu bilansu masowego; jednak w przypadkach szczególnych znaczenie nie musi być absolutnie konieczne. Zaleca się znaczenie przy pomocy ^{14}C, ale przydatne może być również użycie innych izotopów, takich jak ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H. O ile to będzie możliwe, znacznik powinien być umieszczony w najtrwalszej części cząsteczki. Na przykład, jeśli substancja badana zawiera jeden pierścień, wymagane jest znaczenie w pierścieniu; jeśli substancja badana zawiera dwa lub większą liczbę pierścieni, potrzebne mogą być osobne badania dla ustalenia losu każdego zaznaczonego pierścienia i dla uzyskania odpowiednich informacji na temat powstawania produktów hydrolizy. Czystość substancji badanej powinna wynosić co najmniej 95 %.

Przed wykonaniem testu hydrolizy należy zebrać następujące informacje na temat substancji badanej:

a) rozpuszczalność w wodzie (metoda badania A.6);

b) rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych;

c) prężność par (metoda badania A.4) i/lub stała w równaniu Henry'ego;

d) współczynnik podziału n-oktanol/woda (metoda badania A.8);

e) stała dysocjacji (pK_a) (Wytyczna OECD 112) (9);

f) szybkość fototransformacji bezpośredniej i pośredniej w wodzie, w przypadkach, których to dotyczy.

Dostępne powinny być metody analityczne dla oznaczania ilościowego substancji badanej oraz, jeśli jest to ważne, dla identyfikacji i oznaczania ilościowego produktów hydrolizy w roztworach wodnych (zob. także sekcja 1.7.2).

1.6. SUBSTANCJE WZORCOWE

W miarę możliwości przy identyfikacji i ocenie ilościowej produktów hydrolizy metodami spektroskopowymi i chromatograficznymi albo innymi odpowiednio czułymi metodami należy korzystać z substancji wzorcowych.

1.7. KRYTERIA JAKOŚCI

1.7.1. **Odzysk**

Analiza co najmniej dwóch roztworów buforowych albo ich ekstraktów natychmiast po dodaniu substancji badanej daje pierwszą wskazówkę na temat powtarzalności metody analitycznej oraz jednorodności procedury aplikacyjnej dla substancji badanej. Stopnie odzysku dla kolejnych etapów eksperymentów uzyskuje się z odpowiednich bilansów masowych (jeśli używa się materiału znaczonego). Stopnie te powinny się mieścić w zakresie od 90 % do 110 % dla związków chemicznych znaczonych i nieznaczonych (7). W przypadku gdy uzyskanie tego zakresu jest technicznie trudne, odzysk wynoszący 70 % dla związków nieznaczonych jest do przyjęcia, ale należy podać uzasadnienie.

▼B

1.7.2. **Powtarzalność i czułość metody analitycznej**

Powtarzalność metody analitycznej albo metod analitycznych wykorzystywanych do oceny ilościowej substancji badanej i produktów hydrolizy można sprawdzić za pomocą powielanych analiz tych samych roztworów buforowych (lub ich ekstraktów) w późniejszym okresie, po zebraniu wystarczających ilości produktów hydrolizy dla oceny ilościowej.

Metoda analityczna powinna być wystarczająco czuła, aby można było ocenić ilościowo stężenia substancji badanych na poziomie 10 % lub mniej stężenia pierwotnego. Jeśli ma to zastosowanie, metody analityczne powinny także być wystarczająco czułe, aby można było oznaczyć ilościowo dowolny produkt hydrolizy stanowiący 10 % lub więcej stężenia zastosowanego (w dowolnym momencie podczas badania), do 25 % lub mniej jego najwyższego stężenia.

1.7.3. **Przedziały ufności dla danych kinetycznych hydrolizy**

Przedziały ufności należy obliczyć i podać dla wszystkich współczynników regresji, stałych szybkości, okresów połowicznego zaniku oraz wszelkich innych parametrów kinetycznych (np. DT50).

1.8. OPIS METODY BADANIA

1.8.1. **Aparatura i wyposażenie**

Badania należy wykonywać w pojemnikach szklanych (np. w probówkach lub niewielkich kolbkach), w ciemności i w warunkach sterylnych, jeśli jest to konieczne, chyba że informacje wstępne (takie jak współczynnik podziału n-oktanol/woda) wskazują, że substancja badana może przywierać do szkła. W takich przypadkach może zaistnieć potrzeba rozważenia użycia materiałów alternatywnych (takich jak teflon). Być może także uda się zmniejszyć problem przylegania do szkła przy pomocy jednej z poniższych metod:

— określenie masy substancji badanej i produktów hydrolizy zaadsorbowanych do naczynia testowego,

— użycie łaźni ultradźwiękowej,

— zapewnienie mycia rozpuszczalnikiem całego sprzętu szklanego dla każdego odstępu pobierania próbek,

— używanie produktów preparowanych,

— używanie zwiększonej ilości współrozpuszczalnika dla wprowadzania substancji badanej do układu; jeśli używa się współrozpuszczalnika, powinien to być taki materiał, który nie powoduje hydrolizy substancji badanej.

Dla inkubacji różnych roztworów badanych zwykle potrzebne są wstrząsarki z łaźnią wodną o kontrolowanej temperaturze albo inkubatory z termostatyczną kontrolą temperatury.

Potrzebne jest standardowe wyposażenie laboratorium, obejmujące w szczególności:

— pH-metr,

▼B

— przyrządy analityczne, takie jak wyposażenie GC, HPLC i TLC, włącznie z odpowiednimi systemami detekcji dla analizy substancji znaczonych radioaktywnie i nieznaczonych, albo odwrócona metoda rozcieńczeń izotopowych,

— przyrządy dla potrzeb identyfikacji (np. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR itp.),

— cieczowy licznik scyntylacyjny,

— rozdzielacze dla ekstrakcji ciecz-ciecz,

— aparatura do zatężania roztworów i ekstraktów (np. wyparka rotacyjna),

— urządzenie do kontroli temperatury (np. łaźnia wodna).

Odczynniki chemiczne obejmujące na przykład:

— rozpuszczalniki organiczne, cz.d.a., takie jak heksan, dichlorometan itp.,

— ciecz scyntylacyjna,

— roztwory buforowe (szczegóły – zob. sekcja 1.8.3).

Cały sprzęt szklany, wodę o czystości odczynnikowej oraz roztwory buforowe używane w testach hydrolizy należy poddać sterylizacji.

1.8.2. **Wprowadzanie substancji badanej**

Substancja badana powinna być wprowadzana jako roztwór wodny do różnych roztworów buforowych (zob. załącznik 3). Jeśli jest to konieczne dla odpowiedniego rozpuszczenia, dopuszcza się użycie niewielkich ilości rozpuszczalników mieszających się z wodą (takich jak acetonitryl, aceton, etanol) dla wprowadzenia i rozprowadzenia substancji badanej, jednak ilość ta normalnie nie powinna przekraczać 1 % obj. W przypadku jeśli rozważa się użycie wyższych stężeń rozpuszczalników (np. w przypadku słabo rozpuszczalnych substancji badanych), jest to dopuszczalne jedynie jeśli można wykazać, że rozpuszczalnik nie wywiera wpływu na hydrolizę substancji badanych.

Nie zaleca się rutynowego stosowania produktu preparowanego, gdyż nie można wykluczyć, że składniki preparatu mogą wpływać na proces hydrolizy. Jednak dla substancji badanych słabo rozpuszczalnych w wodzie albo dla substancji przywierających do szkła (zob. sekcja 1.8.1) użycie materiału preparowanego może być odpowiednią alternatywą.

Należy stosować jedno stężenie substancji badanej i nie powinno ono przekraczać 0,01 M albo połowy stężenia w stanie nasycenia (zob. załącznik 1).

▼B

1.8.3. **Roztwory buforowe**

Badanie hydrolizy należy wykonywać przy wartościach pH wynoszących 4, 7 oraz 9. W tym celu należy przygotować roztwory buforowe, używając chemikaliów cz.d.a. oraz wody. Pewne przydatne układy buforowe przedstawiono w załączniku 3. Należy podkreślić, że stosowany układ buforowy może wpływać na szybkość hydrolizy, i tam gdzie taki wpływ jest obserwowany należy użyć alternatywnego układu buforowego ([1]).

Wartość pH dla każdego roztworu buforowego należy sprawdzać wykalibrowanym pH-metrem z dokładnością do co najmniej 0,1 jednostki w wymaganej temperaturze.

1.8.4. **Warunki badania**

1.8.4.1. *Temperatura badania*

Badania dotyczące hydrolizy należy prowadzić w stałych temperaturach. Dla potrzeb ekstrapolacji ważne jest utrzymywanie temperatury z dokładnością co najmniej do + 0,5°C.

Test wstępny (poziom 1) należy wykonać w temperaturze 50 °C, jeśli hydrolityczne zachowanie się substancji badanej jest nieznane. Testy kinetyczne na wyższych poziomach należy prowadzić w minimum trzech temperaturach (włącznie z testem w 50 °C), chyba że substancja badana okaże się odporna na hydrolizę w teście początkowym. Sugerowany zakres temperatur to 10–70 °C (korzystnie z przyjęciem co najmniej jednej temperatury poniżej 25 °C), co obejmuje temperaturę podawaną w sprawozdaniu z badań, wynoszącą 25 °C, oraz większość temperatur spotykanych w warunkach polowych.

1.8.4.2. *Światło i tlen*

Wszystkie badania hydrolizy należy prowadzić przy użyciu odpowiedniej metody, aby uniknąć wpływów fotolitycznych. Należy podjąć wszelkie stosowne środki, aby uniknąć obecności tlenu (np. barbotując przez ciecz hel, azot albo argon, w ciągu 5 minut, przed przygotowaniem roztworu).

1.8.4.3. *Czas trwania testu*

Test wstępny powinien trwać 5 dni, natomiast testy na wyższych poziomach należy kontynuować, aż hydrolizie ulegnie 90 % substancji badanej albo przez okres 30 dni, zależnie od tego, co nastąpi wcześniej.

1.8.5. **Wykonanie badania**

1.8.5.1. *Test wstępny (poziom 1)*

Test wstępny wykonuje się w temperaturze 50 ± 0,5°C i przy pH = 4,0, 7,0 oraz 9,0. Jeśli po 5 dniach obserwuje się hydrolizę na poziomie mniejszym niż 10 % (t0,5 25 °C > 1 rok), substancję badaną uznaje się za trwałą hydrolitycznie i normalnie nie są wymagane żadne dodatkowe testy. Jeśli o substancji wiadomo, że nie jest ona trwała w temperaturach występujących w środowisku naturalnym ([2]), test wstępny nie jest wymagany. Metoda analityczna musi być wystarczająco dokładna i czuła, aby wykrywała spadek wynoszący 10 % stężenia początkowego.

([1]) Mabey i Mill zalecają używanie buforów boran owych lub octanowych zamiast fosforanowych (11).

([2]) Informacje takie mogą pochodzić z innych źródeł, takich jak dane dotyczące hydrolizy dla strukturalnie podobnych związków – z literatury albo ze wstępnych półilościowych testów hydrolizy dla substancji badanej, wykonanych na wcześniejszym etapie.

▼B

1.8.5.2. *Hydroliza substancji nietrwałych (poziom 2)*

Test na wyższym poziomie (test zaawansowany) należy wykonywać przy wartościach pH, dla których stwierdzono w teście wstępnym, że substancja badana jest nietrwała. Roztwory substancji badanej w buforach należy termostatować w wybranych temperaturach. Przy testach na kinetykę pierwszego rzędu każdy roztwór reakcyjny należy analizować w odstępach czasu, które zapewniają co najmniej sześć równomiernie rozmieszczonych punktów pomiarowych, zwykle pomiędzy 10 % a 90 % hydrolizy substancji badanej. Należy pobierać pojedyncze próbki dla analiz powtórnych (co najmniej po dwie próbki pobierane do osobnych zbiorniczków reakcyjnych) i przeanalizować ich zawartość dla każdego z co najmniej sześciu okresów czasu (dla co najmniej dwunastu punktów zawierających dane). Pobieranie za każdym razem jednej dużej próbki roztworu badanego, z której pobiera się mniejsze ilości dla analiz powtórnych, uznaje się za niewłaściwe, gdyż procedura taka nie pozwala na analizę zmienności danych i może prowadzić do problemów z zanieczyszczaniem roztworu badanego. Na koniec badania na wyższym poziomie (to znaczy przy 90 % hydrolizy albo po 30 dniach) należy wykonywać testy potwierdzające sterylność. Jeśli jednak nie obserwuje się rozkładu (to znaczy transformacji), przeprowadzenie testów na sterylność nie uważa się za konieczne.

1.8.5.3. *Identyfikacj a produktów hydrolizy (poziom 3)*

Wszelkie główne produkty hydrolizy, a co najmniej te, które reprezentują > 10 % zastosowanej dawki, powinny zostać zidentyfikowane przy pomocy odpowiednich metod analitycznych.

1.8.5.4. *Testy opcjonalne*

Dla hydrolitycznie nietrwałej substancji badanej wymagane mogą być dodatkowe testy przy wartościach pH innych niż 4, 7 oraz 9. Na przykład dla potrzeb fizjologicznych, potrzebny może być test w warunkach bardziej kwaśnych (np. pH = 1,2) i w jednej temperaturze mającej znaczenie fizjologiczne (37 ^{o}C).

2. **DANE**

Ilości substancji badanej i produktów hydrolizy, jeśli takie istnieją, należy podawać w % zastosowanego stężenia początkowego oraz, tam gdzie ma to zastosowanie, w mg/l, dla każdego punktu (czasu) poboru próbek, dla każdej wartości pH oraz dla każdej temperatury. Dodatkowo, jeśli użyto znaczonej substancji badanej, należy podać bilans masowy w procentach zastosowanego stężenia początkowego.

Należy przygotować prezentację graficzną logarytmicznie przetworzonych danych dla stężeń substancji badanej w funkcji czasu. Wszelkie główne produkty hydrolizy, a przynajmniej te stanowiące > 10 % użytej dawki, powinny zostać zidentyfikowane, a ich przetworzone logarytmicznie stężenia powinny być również wykreślone w ten sam sposób, co substancja macierzysta, aby pokazać szybkości ich powstawania i zaniku.

▼B

2.1. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Dokładniejsze oznaczenie okresów połowicznego zaniku lub wartości DT_{50} powinno się uzyskać stosując obliczenia na bazie odpowiedniego modelu kinetycznego. Okresy połowicznego zaniku i/lub wartości DT_{50} (włącznie z granicami przedziału ufności) należy podawać dla każdej wartości pH oraz wartości temperatury, wraz z opisem użytego modelu, rzędu kinetyki oraz współczynnika determinacji (r^2). Jeśli jest to właściwe, obliczenia należy także stosować dla produktów hydrolizy.

W przypadku badań szybkości wykonywanych w różnych temperaturach stałe szybkości pseudo pierwszego rządu dla hydrolizy (kobs) należy przedstawić jako funkcję temperatury. Obliczenie powinno być oparte zarówno na rozdzieleniu wartości kobs na stałe szybkości dla hydrolizy katalizowanej kwasem, hydrolizy neutralnej i hydrolizy katalizowanej zasadą (odpowiednio kH, kneutral i k0H), jak i na równaniu Arrheniusa:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

gdzie A_i i B_i są stałymi regresji, odpowiednio z punktu przecięcia się osią rzędnych i z nachylenia, dla najlepiej pasujących linii wygenerowanych z przeprowadzenia regresji liniowej ln k_i w funkcji odwrotności temperatury absolutnej w Kelvinach (T). Przy pomocy zależności Arrheniusa dla hydrolizy katalizowanej kwasem, hydrolizy neutralnej i hydrolizy katalizowanej zasadą można wyliczyć stałe szybkości pseudo pierwszego rzędu, a tym samym okresy połowicznego zaniku, dla innych temperatur, w których bezpośrednie doświadczalne oznaczenie stałej szybkości nie jest praktycznie możliwe (10).

2.2. OCENA I INTERPRETACJA WYNIKÓW

Większość reakcji hydrolizy przebiega zgodnie z kinetyką reakcji pozornie pierwszego rzędu i dlatego okresy połowicznego zaniku są niezależne od stężenia (zob. równanie 4 w załączniku 2). Pozwala to zwykle na stosowanie wyników laboratoryjnych oznaczonych dla 10^{-2} do 10^{-3} M do warunków występujących w środowisku naturalnym (< 10^{-6} M) (10). Mabey i Mill (11) przedstawili kilka przykładów dobrej zgodności pomiędzy szybkościami hydrolizy zmierzonymi w wodzie czystej i w wodach naturalnych dla różnorodnych związków chemicznych, pod warunkiem że mierzy się zarówno pH, jak i temperaturę.

3. **OPRACOWANIE SPRAWOZDANIA**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań musi obejmować co najmniej następujące informacje:

Substancja badana:

— nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna, numer CAS, wzór strukturalny (z pokazaniem miejsca znaczenia, kiedy używa się materiału znaczonego radioaktywnie) oraz stosowne własności fizykochemiczne (zob. sekcja 1.5),

— czystość (zanieczyszczenia) substancji badanej,

— czystość oznaczenia znaczonego związku chemicznego oraz aktywność molowa (jeśli dotyczy),

▼B

— roztwory buforowe,

— daty i szczegóły dotyczące przygotowania,

— użyte bufory i rodzaje wody,

— molowość i pH roztworów buforowych.

Warunki badania:

— daty wykonania badań,

— ilość zastosowanej substancji badanej,

— metoda i rozpuszczalniki (rodzaj i ilość) użyte dla zastosowania substancji badanej,

— objętość inkubowanych buforowanych roztworów substancji badanej,

— opis układu użytego do inkubacji,

— pH i temperatura w trakcie badania,

— czasy pobierania próbek,

— metoda/metody ekstrakcji,

— metody oceny ilościowej i identyfikacji substancji badanej oraz produktów jej hydrolizy w roztworach buforowych,

— liczba powtórzeń.

Wyniki:

— powtarzalność i czułość użytych metod analitycznych,

— stopnie odzysku (wartości procentowe dla ważności badania podano w sekcji 1.7.1),

— dane dla powtórzeń i wartości średnie w formie tabeli,

— bilans masowy w trakcie i na koniec badań (jeśli użyta została znaczona substancja badana),

— wyniki testu wstępnego,

— omówienie i interpretacja wyników,

— wszelkie oryginalne dane i liczby.

Poniższe informacje są wymagane jedynie kiedy oznacza się szybkość hydrolizy:

— wykresy stężeń w funkcji czasu dla substancji badanej i, w stosownych przypadkach, dla produktów hydrolizy przy każdej wartości pH oraz temperatury,

— tabele wyników z równania Arrheniusa dla temperatury 20 ^{o}C/25 ^{o}C, z podaniem pH, stałej szybkości [h^{-1} lub $dzień^{-1}$], okresu połowicznego zaniku albo DT_{50}, temperatur [^{o}C], włącznie z granicami dla przedziału ufności i współczynnikami korelacji (r^2) albo porównywalnymi informacjami,

— proponowany przebieg (cykl przemian w trakcie) hydrolizy.

▼B

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111 [OECD (1981).

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796,3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 ^{o}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) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

(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 Nr. 55, Teil I und II: Prufung 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 [SETAC (1995).

(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 Nr.23 [OECD (2000).

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 – 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals [OECD (1993).

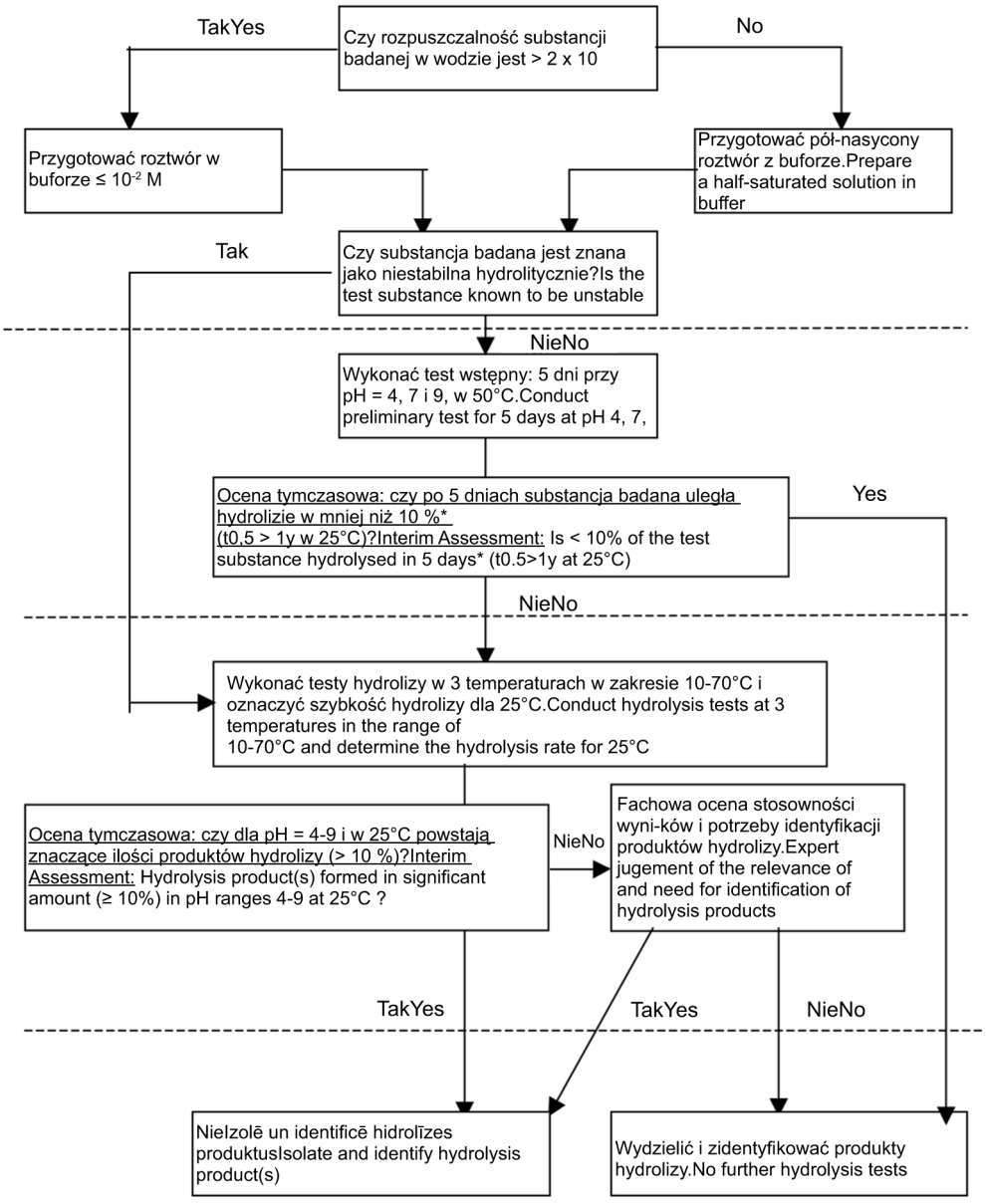
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(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, 383–415.

▼B

ZAŁĄCZNIK 1

Wielopoziomowy schemat badania hydrolizy



* Testējamās vielas 10% hidrolīze pie 50°C atbilst apmēram 30 dienu pussadalīšanās periodam, kas savukārt atbilst aptuveni 1 gadam 25°C temperatūrā.Nie wykonywać dalszych te-stów hydrolizy.

▼B

ZAŁĄCZNIK 2

Definicje i jednostki

W każdym przypadku należy stosować **międzynarodowy układ jednostek miar (SI).**

Substancja badana: dowolna substancja, niezależnie od tego, czy jest to związek macierzysty, czy odpowiednie produkty transformacji.

Produkty transformacji: wszystkie substancje powstające w biotycznych lub abiotycznych reakcjach transformacji substancji badanej.

Produkty hydrolizy: wszystkie substancje powstające w reakcjach transformacji hydrolitycznej substancji badanej.

Hydroliza dotyczy reakcji substancji badanej RX z wodą, z wymianą grupy X na grupę OH w centrum reakcyjnym:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Szybkość, z jaką stężenie RX spada w tym uproszczonym procesie, podaje się równaniem

szybkość = k $[H_2O]$ [RX] reakcja drugiego rzędu

albo

szybkość = k [RX] reakcja pierwszego rzędu

zależnie od etapu decydującego o szybkości. Ponieważ woda jest obecna w dużym nadmiarze w stosunku do substancji badanej, ten typ reakcji zwykle opisuje się jako reakcję pseudopierwszego rzędu, w której obserwowaną stałą reakcji podaje zależność

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

i można ją wyznaczyć z wyrażenia (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

gdzie:

t = czas,

a C_o, C_t = stężenia RX dla czasu wynoszącego 0 oraz t.

Wymiar dla tej stałej to (jednostka czasu)$^{-1}$, a okres połowicznego zaniku dla reakcji (czas, po którym przereaguje 50 % RX) podaje równanie

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Okres połowicznego zaniku: ($t_{0,5}$) to czas potrzebny dla osiągnięcia 50 % hydrolizy substancji badanej, kiedy reakcję można opisać kinetyką pierwszego rzędu; zależy on od stężenia.

(*) Jeśli wykres danych w skali logarytmicznej jako funkcji czasu nie jest linią prostą (co równa się szybkości reakcji pierwszego rzędu), wówczas nie można wykorzystywać równania [3] do określania stałej szybkości hydrolizy dla substancji badanej.

▼B

DT_{50} (Disappearance Time 50 = czas zaniku 50): to czas, po którym stężenie substancji badanej zmniejsza się o 50 %; jest on różny od okresu połowicznego zaniku $t_{0,5}$, kiedy reakcja nie stosuje się do kinetyki pierwszego rzędu.

Ocena k w innej temperaturze

Kiedy znane są stałe szybkości reakcji w dwóch temperaturach, stałe szybkości w innych temperaturach można wyprowadzić z równania Arrheniusa:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ lub } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Wykres ln k w funkcji l/T jest linią prostą o nachyleniu -E/R

gdzie:

k = stała szybkości, mierzona w różnych temperaturach,

E = energia aktywacji (kJ/mol),

T = temperatura absolutna (K),

R = stała gazowa (8,314 J/mol.K).

Energię aktywacji wyliczono za pomocą analizy regresyjnej albo następującego równania:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

w którym: $T_2 > T_1$

▼B

ZAŁĄCZNIK 3

Układy buforowe

A. **CLARK i LUBS:**

Mieszaniny buforowe według CLARKA i LUBSA (*)

Skład	pH
0,2 N HC1 + 0,2 N KC1 przy 20 °C	
47,5 ml HC1 + 25 ml KC1 rozcieńczyć do 100 ml	1,0
32,25 ml HC1 + 25 ml KC1 rozcieńczyć do 100 ml	1,2
20,75 ml HC1 + 25 ml KC1 rozcieńczyć do 100 ml	1,4
13,15 ml HC1 + 25 ml KC1 rozcieńczyć do 100 ml	1,6
8,3 ml HC1 + 25 ml KC1 rozcieńczyć do 100 ml	1,8
5,3 ml HC1 + 25 ml KC1 rozcieńczyć do 100 ml	2,0
3,35 ml HC1 + 25 ml KC1 rozcieńczyć do 100 ml	2,2
0,1 M kwasny ftalan potasu + 0,1 N HC1 przy 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HC1 + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HC1 + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HC1 + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HC1 + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HC1 + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HC1 + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HC1 + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HC1 + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HC1 + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	3,8
0,1 M kwaśny ftalan potasu + 0,1 N HCl przy 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	4,8

(*) Wartości pH podane w tych tabelach zostały obliczone na podstawie pomiarów potencjału, przy wykorzystaniu standardowych równań Sórensena (1909). Odpowiadające im wartości pH są o 0,04 jednostki wyższe od wartości podanych w tabeli.

▼B

Skład	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwaśnego ftalanu do 100 ml	6,0

Mieszaniny buforowe według CLARKA i LUBSA (ciąg dalszy)

0,1 M fosforan monopotasu + 0,1 N NaOH przy 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 mll	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 m	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 ml	8,0
0,1 M H_3B0_3 w 0,1 M KC1 + 0,1 N NaOH przy 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF i VLEESCHHOUWER:**

Bufory cytrynianowe według KOLTHOFFA i VLEESCHHOUWERA

Sklad	pH
0,1 M cytrynian monopotasu i 0,1 N HC1 przy 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HC1 + 50 ml cytrynianu do 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl+50 ml cytrynianu do 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml cytrynianu do 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml cytrynianu do 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl+50 ml cytrynianu do 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml cytrynianu do 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml cytrynianu do 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml cytrynianu do 100 ml	3,6
0,1 M cytrynian monopotasu i 0,1 N HCl przy 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml	6,0

(*) Dodać niewielkie kryształki tymolu lub podobnej substancji aby zapobiec rozwojowi pleśni.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Mieszaniny boranowe według SÓRENSENA

Skład		Sörensen 18 °C	Valbum, pH przy		
ml boraksu	ml HCl/NaO H		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M boraksu + 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 boraksu + 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

Mieszaniny fosforanowe według SÖRENSENA

Skład	pH
0,0667 M fosforan monopotasu + 0,0667 M fosforan disodu przy 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. TOKSYCZNOŚĆ DŻDŻOWNIC

BADANIE SZTUCZNEJ GLEBY

1. METODA

1.1. WSTĘP

W tym badaniu laboratoryjnym substancja testowa dodawana jest do sztucznej gleby, w której umieszcza się dżdżownice na okres 14 dni. Po zakończeniu tego okresu (i opcjonalnie po siedmiu dniach) badane są skutki śmiertelności dżdżownic wywołane przez substancję testową. Badanie dostarcza metody na względnie krótkoterminowe badanie skutków substancji chemicznej na dżdżownice pobieranej przez skórę i układ pokarmowy.

1.2. DEFINICJA I JEDNOSTKA

LC_{50}: Stężenie substancji testowej ocenione jako powodujące śmierć u 50 % badanych zwierząt w okresie przeprowadzania badania.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Substancja odniesienia używana jest okresowo jako środek pozwalający określić, iż czułość systemu badawczego nie uległa znacznej zmianie.

Analityczny stopień chloroacetamidu zalecany jest jako substancja odniesienia.

1.4. ZASADA BADANIA

Ziemia stanowi zmienną pożywkę, dlatego też do tego badania wykorzystywana jest starannie określona sztuczna gleba. Dorosłe dżdżownice z gatunku *Eisenia foetida* (zob. uwaga w dodatku) utrzymywane są w ściśle określonej sztucznej glebie poddawanej działaniu różnych stężeń substancji testowej. Zawartość zbiorników rozłożona jest na tacach przez okres 14 dni (i opcjonalnie przez siedmiu dniach) po rozpoczęciu badania oraz zliczane są osobniki pozostałe przy życiu po ekspozycji na działanie każdej wielkości stężenia substancji testowej.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

Badanie zaprojektowano w taki sposób, aby było jak najbardziej odtwarzalne w odniesieniu do badanego substrata i organizmu. Śmiertelność w grupach kontrolnych nie może przekraczać 10 % po zakończeniu badania, w przeciwnym razie badanie uważa się za nieważne.

1.6. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.6.1. *Materiały*

1.6.1.1. Substrat testowy

Zdefiniowana sztuczna gleba używana jest jako podstawowy substrat testowy.

a) Podstawowy substrat (procenty w przeliczeniu na suchą masę)

— 10 % torf sfagnowy (o możliwie jak najbardziej zbliżonym pH 5,5–6,0 bez widocznych pozostałości roślinnych i drobnomielony).

▼B

— 20 % gliny laolinitowej, najlepiej z ponad 50 % zawartością kaolinitu.

— Około 69 % przemysłowego piasku kwarcowego (przewaga piasku drobnoziarnistego z ponad 50 % zawartością cząsteczek o wielkości 0,05–0,2 mm). W przypadku gdy substancja nie rozrzedza się w wodzie w sposób wystarczający, 10 g badanego substrata należy zachować z danego zbiornika w celu późniejszego zmieszania z substancja testową.

— Dodaje się około 1 % węglanu wapnia ($CaCO_3$), sproszkowanego, chemicznie czystego w celu uzyskania pH do 6,0 ± 0,5.

b) Substrat testowy

Substrat testowy zawiera substrat podstawowy, substancję testową i dejonizowaną wodę.

Zawartość wody wynosi około 25–42 % suchej masy substrata podstawowego. Zawartość wody w substracie, ustalana jest przez osuszanie próbki do stałej masy przy 105 °C. Kluczowym kryterium jest nawilżanie sztucznej gleby do takiego momentu, aby nie powstały wody stojące. Należy zachować ostrożność podczas mieszania w celu równomiernego rozłożenia substancji testowej i substrata. Sposób wprowadzenia substancji testowej do substrata należy opisać.

c) Substrat kontrolny

Substrat kontrolny zawiera substrat podstawowy i wodę. W przypadku wprowadzenia dodatkowego czynnika, dodatkowy substrat kontrolny powinien zawierać tę samą ilość dodatkowego czynnika.

1.6.1.2. Zbiorniki testowe

Szklane zbiorniki o pojemności około jednego litra (odpowiednio przykryte plastikowymi pokrywkami, naczynia lub folie z tworzywa sztucznego z otworami wentylacyjnymi) wypełnione pewną ilością nawilżonego lub kontrolnego substrata, równowartość 500 g suchej masy substrata.

1.6.2. *Warunki badania*

Zbiorniki należy przechowywać w klimatyzowanych komorach w temperaturze 20 ± 2 °C w stałym oświetleniu. Natężenie oświetlenia powinno wynosić 400–800 luksów.

Okres badania wynosi 14 dni, ale śmiertelność można fakultatywnie ocenić na siedem dni po rozpoczęciu badania.

1.6.3. *Procedura badania*

Stężenia substancji testowej

Stężenia substancji testowej wyrażone są jako waga substancji na suchą masę substrata podstawowego (mg/kg).

Test ustalania zakresu stężeń

Wielkość stężeń powodująca śmiertelność 0–100 % można ustalić przez test ustalania zakresu stężeń w celu przekazania informacji o zakresie stężeń wykorzystywanym w ostatecznym badaniu.

▼B

Substancję należy zbadać przy następujących wielkościach stężeń: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg substancji/kilogram badanego substrata (sucha masa).

W przypadku przeprowadzenia w pełni badania ostatecznego jedna grupa badana na daną wielkość stężenia i jedna grupa kontrolna niepoddana działaniu substancji, każda zawierająca 10 dżdżownic, powinna być wystarczająca w celu wykonania testu ustalania zakresu stężeń.

Badanie ostateczne

Wyniki testu ustalania zakresu stężeń wykorzystywane są w celu wybrania co najmniej pięciu wielkości stężeń uszeregowanych geometrycznie, obejmujących zakres 0–100 % śmiertelności i różniących się stałym czynnikiem nie przekraczającym 1,8.

Badania wykorzystujące te serie stężeń powinny umożliwić ustalenie wartości LC_{50} oraz jej granic pewności najdokładniej jak to możliwe.

W badaniu ostatecznym należy użyć co najmniej cztery grupy badane przy danej wielkości stężenia i cztery grupy kontrolne niepoddane działaniu substancji, każda zawierająca 10 dżdżownic. Wyniki takich replikujących grup podawane są jako średnia i odchylenie standardowe.

W przypadku gdy dwa równoległe stężenia o wielkości 1,8, powodują 0 % i 100 % śmiertelności, takie dwie wartości są wystarczające do oznaczenia zakresu, w którym obniża się LC_{50}.

Mieszanina podstawowego substrata testowego i substancji testowej.

Badany substrat, jeżeli możliwe, nie powinien zawierać dodatkowych czynników innych niż woda. Bezpośrednio przed rozpoczęciem badania, zawiesina substancji testowej lub substancja testowa rozrzedzona w dejonizowanej wodzie lub innym rozpuszczalniku jest mieszana z podstawowym substratem testowym, lub równomiernie nad nim rozpylana za pomocą drobnego spryskiwacza chromatograficznego lub podobnego.

Jeżeli substancja testowa nie jest rozpuszczalna w wodzie, może być rozpuszczona w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym, w możliwie jak najmniejszej ilości (np. heksan, aceton lub chloroform).

Jedynie czynniki łatwo ulatniające się mogą być użyte w celu rozpuszczenia, rozrzedzenia lub zemulgowania substancji testowej. Badany substrat należy wietrzyć przed użyciem. Należy uzupełniać ilość wyparowanej wody. Grupa kontrolna powinna zawierać tę samą ilość każdego dodawanego czynnika.

Jeżeli substancja testowa jest nierozpuszczalna, nierozrzedzalna lub nie emulguje w rozpuszczalnikach organicznych, należy zmieszać 10 g drobnoziarnistego piasku kwarcowego oraz taką ilość substancji testowej, jaka wymagana jest przy 500 g suchej masy sztucznej gleby z 490 g suchej masy badanego substrata.

W odniesieniu do każdej badanej grupy, należy umieścić ilość nawilżonego badanego substrata równą 500 g suchej masy w każdym szklanym zbiorniku wraz z 10 dżdżownicami, które przebywały przez okres 24 godzin w podobnych warunkach tj. w warunkach nawilżonego substrata podstawowego, a następnie zostały szybko umyte, a nadwyżka wody została wchłonięta w bibułę filtracyjną przed użyciem.

▼B

Zbiorniki przykrywa się perforowanymi plastikowymi pokrywkami, naczyniami lub folią w celu zapobieżenia wysychaniu substrata i utrzymuje się je w warunkach badania przez okres l4 dni.

Oszacowania należy dokonać 14 dni (opcjonalnie po siedmiu dniach) po rozpoczęciu badania. Substrat rozkładany jest na szklanej płytce lub płytce wykonanej ze stali nierdzewnej. Należy przeprowadzić badanie dżdżownic oraz ustalić liczbę osobników pozostałych przy życiu. Dżdżownice uważa się za martwe, jeżeli nie reagują na delikatne bodźce mechaniczne oddziałujące z przodu organizmu osobnika.

W przypadku gdy badanie przeprowadzane jest po siedmiu dniach, zbiornik ponownie napełniany jest substratem testowym, a osobniki pozostałe przy życiu są przenoszone na powierzchnię z tym samym substratem testowym.

1.6.4. *Badane organizmy*

Organizmy poddane badaniu powinny być osobnikami dorosłymi *Eisenia foetida* (zob. uwagi w Dodatku) (w wieku dwóch miesięcy życia z ukształtowanym siodełkiem) o wadze nawilżonego ciała 300–600 mg (metody uprawy, zob. dodatek).

2. **DANE**

2.1. OBRÓBKA I ANALIZA WYNIKÓW

Stężenia testowej substancji odnotowywane są w odniesieniu do procentowej ilości martwych dżdżownic.

Jeżeli dane są zadowalające, należy ustalić wartość LC_{50} oraz limity pewności (p = 0,05) wykorzystując standardowe metody (Litchfield i Wilcoxon, 1949, metoda równoważna). LC_{50} należy podać jako miligram substancji testowej na kilogram badanego substrata (sucha masa).

W przypadkach gdy nachylenie krzywej stężenia jest zbyt strome aby umożliwić obliczenie LC_{50}, wystarczające jest graficzne oszacowanie tej wartości.

W przypadku gdy dwie kolejne wielkości stężenia o wskaźniku w wysokości 1,8 powodują jedynie śmiertelność 0 % i 100 %, te dwie wartości są wystarczające do oznaczenia granicy, przy której obniża się LC_{50}.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— stwierdzenie, że badanie zostało przeprowadzone zgodnie z wyżej wymienionymi kryteriami jakości,

— przeprowadzone badanie (badanie zakresu wielkości stężeń i/lub badanie ostateczne),

— dokładny opis warunków badania lub stwierdzenie, że badanie zostało przeprowadzone zgodnie z metodą; wszelkie odstępstwa od procedury metody należy odnotować,

— dokładny opis procedury mieszania substancji testowej z podstawowym substratem testowym,

— informacja o badanych organizmach (gatunki, wiek, średnia oraz rozpiętość wagi, warunki hodowli i utrzymywania, dostawca),

▼B

— metoda używana w celu ustalenia LC_{50},

— wyniki badania łącznie ze wszelkimi wykorzystanymi danymi,

— opis obserwowanych objawów i zmian w zachowaniu badanych organizmów,

— śmiertelność w grupach kontrolnych.

— LC_{50} lub najwyższa wielkość stężenia testowego nie powodująca śmiertelności oraz najniższa wielkość stężenia powodująca 100 %, śmiertelności na 14 dni (oraz fakultatywnie siedem dni) po rozpoczęciu badania,

— wykreślanie krzywej/stężenia w odniesieniu do powodowanej reakcji,

— wyniki otrzymane po zastosowaniu substancji odniesienia, oraz czy zostały połączone z obecnym badaniem, czy na podstawie wcześniejszej kontroli jakości.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD, Paryż, 1981, *Wytyczne Badania* 201, ostateczna decyzja Rady C(81) 30.

(2) Edwards, C. A. i Lofty, J. R., 1977, *Biologia Dżdżownic,* Chapman i Hall, Londyn, str. 331.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecologie et Systétmatique,* Institut National de la Recherche Agronomique, str. 671.

(4) Litchfield, J. T. i Wilcoxon, F., Uproszczona metoda oceny badań skutków dawkowania. *J. Pharm. Exp. Therap.,* tom 96, 1949, str. 99.

(5) Komisja Wspólnot Europejskich, *Rozwój standardowej metody laboratoryjnej odnośnie oceny wpływu toksyczności substancji chemicznych na dżdżownice*, Sprawozdanie 8714 EUR EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt fur Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitat-stest am Regenwurm *Eisenia foetida* in kunstlichem Boden", in: Rudolph/Boje, *Okotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Dodatek

Hodowla i utrzymywanie dżdżownic przed rozpoczęciem badania

W celu założenia hodowli zwierząt należy umieścić 30–50 dorosłych dżdżownic w zbiorniku hodowlanym zawierającym świeży substrat i usunąć po okresie 14 dni. Zwierzęta te można wykorzystać do hodowli kolejnych grup. Dżdżownice wylężone z kokonów wykorzystuje się do badania po osiągnięciu dojrzałości (zgodnie z zalecanymi warunkami po okresie dwóch do trzech miesięcy).

Warunki utrzymywania i hodowli

Komora klimatyczna:	temperatura 20 ± 2 °C najlepiej stałym oświetleniem ze (natężenie 400–800 luksów).
Zbiorniki hodowlane:	odpowiednio płytkie zbiorniki o pojemności 10–20 1.
Substrat:	*Eisenia foetida* może być hodowana w różnych ekskrementach zwierzęcych. Zaleca się użycie mieszaniny o składzie 50 % torfu i 50 % krowiego lub końskiego obornika jako pożywki hodowlanej. Pożywka powinna zawierać wartość pH w wysokości około 6–7 (regulowanej węglanem wapnia) oraz niską przewodność elektryczną (mniej niż 6 mmhos lub 0,5 % stężenia soli). Substrat należy odpowiednio nawilżać, ale niezbyt obficie. Oprócz wyżej wspomnianej metody, można zastosować inne odpowiednie procedury.

Uwaga: *Eisenia foetida* występuje w dwóch rasach, które niektórzy systematycy podzielili na dwa gatunki (Bouche, 1972). Gatunki te są podobne pod względem morfologicznym, ale jeden, *Eisenia foetida foetida*, posiada typowo poprzeczne paskowanie lub przedziały na segmentach, a drugi, *Eisenia foetida andrei*, takiego paskowania nie posiada, będąc jednocześnie różnobarwnego czerwonawego koloru. Jeżeli jest to możliwe, należy użyć *Eisenia foetida andrei.* Można użyć inne gatunki, jeżeli dostępna jest metodologia.

▼B

C.9. **BIODEGRADACJA**

BADANIE ZAHN-WELLENS

1. **METODA**

1.1. WSTĘP

Celem metody jest ocena wpływu całkowitej biodegradacji rozpuszczalnych w wodzie, nielotnych substancji organicznych w przypadku ich ekspozycji na stosunkowo wysokie stężenia drobnoustrojów w badaniu statycznym.

Może mieć miejsce fizyczna i chemiczna adsorpcja zawieszonych substancji stałych, co należy wziąć pod uwagę przy interpretacji wyników (zob. 3.2).

Substancje przeznaczone do badania wykorzystuje się w stężeniach odpowiadających wartościom DOC w przedziale 50–400 mg/litr lub wartościom COD w przedziale 100–1 000 mg/litr (DOC = rozwiązany węgiel organiczny; COD = chemiczne zapotrzebowanie tlenu). Te względnie wysokie stężenia posiadają zaletę wiarygodności analitycznej. Związki o właściwościach toksycznych mogą opóźnić lub zahamować proces degradacji.

W niniejszej metodzie pomiar stężenia rozwiązanego węgla organicznego lub chemicznego zapotrzebowania tlenu wykorzystywany jest w celu określenia całkowitej biodegradacji substancji testowej.

Równoczesne użycie szczególnej metody analitycznej może umożliwić ocenę podstawowej biodegradacji substancji (zanik pierwotnej budowy chemicznej).

Metodę stosuje się jedynie w odniesieniu do tych organicznych substancji testowych, które przy wielkości stężenia używanego w badaniu:

— są rozpuszczalne w wodzie w warunkach badania,

— posiadają nieznaczne ciśnienie pary w warunkach badania,

— nie hamują bakterii,

— są absorbowane w badanym systemie jedynie do pewnego stopnia,

— nie są tracone w wyniku wytwarzania piany z roztworu testowego,

Informacje dotyczące względnych części składowych materiału testowego będą użyteczne przy interpretacji otrzymanych wyników, w szczególności w tych przypadkach, gdzie wyniki są słabe lub marginalne.

Pożądane są informacje dotyczące wpływu toksyczności substancji na drobnoustroje w celu dokonania interpretacji słabych wyników oraz wyboru właściwych wielkości stężeń.

▼B

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Wielkość degradacji osiągniętej na końcu badania odnotowywana jest jako „Biodegradacja w badaniu Zahn-Wellens”:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

gdzie:

DT = (%) biodegradacji w czasie T,

CA = wartości DOC (lub COD) w mieszaninie testowej zmierzone trzy godziny po rozpoczęciu badania (mg/l) (DOC = rozwiązany węgiel organiczny, COD = chemiczne zapotrzebowanie tlenu),

CT = wartości DOC lub COD w mieszaninie testowej w chwili pobierania próbek (mg/l),

CB = wartość DOC lub COD próbki ślepej w chwili pobierania próbek (mg/l),

CBA = wartość DOC lub COD próbki ślepej, mierzona trzy godziny po rozpoczęciu testu (mg/l).

Stopień degradacji jest zaokrąglany do najbliższej pełnej wartości procentowej.

Procentową degradację stwierdza się jako procent ubytku DOC (lub COD) z substancji testowej.

Różnica między mierzoną wartością po trzech godzinach i obliczoną, lub najlepiej zmierzoną wartością początkową, może dostarczyć użytecznych informacji dotyczących wydzielania substancji (zob. 3.2, Interpretacja wyników).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

W niektórych przypadkach, w przypadku badania nowych substancji użyteczne mogą okazać się substancje odniesienia; jednakże nie można jeszcze zalecić szczególnych substancji odniesienia.

1.4. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Aktywny szlam, pożywki mineralne i materiał testowy jako jedyne źródło węgla w roztworach wodnych umieszczane są razem w jednym z czterolitrowych szklanych zbiorników wyposażonych w mieszadło i napowietrzacz. Mieszanina jest mieszana i napowietrzana przy temperaturze 20–25 °C przy rozproszonym oświetleniu lub w ciemnym pomieszczeniu przez okres 28 dni. Proces degradacji jest kontrolowany przez oznaczanie wartości DOC (lub COD) w filtrowanym roztworze codziennie lub w innych właściwych, regularnych odstępach czasu. Stosunek wydzielonego DOC (lub COD) po każdym przedziale czasu do wartości, trzy godziny po rozpoczęciu, wyrażany jest jako procent biodegradacji i służy jako pomiar stopnia degradacji w danym czasie. Wynik nanoszony jest na wykres względem czasu, w celu uzyskania krzywej biodegradacji.

W przypadku użycia szczególnej metody analitycznej można dokonać pomiaru zmian w stężeniu pierwotnej molekuły w wyniku biodegradacji (podstawowa biodegradacja).

▼B

1.5. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

Odtwarzalność niniejszego badania została pozytywnie potwierdzona w próbie pierścieniowej.

Czułość metody jest przeważnie ustalana przez zmienność próbki ślepej i, w mniejszym stopniu, przez precyzyjne oznaczenie rozwiązanego węgla organicznego i poziomu badanego związku w roztworze.

1.6. OPIS PROCEDURY BADAWCZEJ

1.6.1. *Przygotowania*

1.6.1.1. O d c z y n n i k i

Woda testowa: woda pitna o zawartości węgla organicznego < 5 mg/litr. Łączne stężenie jonów wapnia i magnezu nie może przekraczać 2,7 mola/litr; w przeciwnym razie wymagane jest odpowiednie rozcieńczenie wodą dejonizowaną lub destylowaną.

Kwas siarkowy, analityczny odczynnik (A.R.):	50 g/l
Roztwór wodorotlenku sodu czysty analitycznie:	40 g/l
Mineralna pożywka: rozpuszczona w jednym litrze dejonizowanej wody:	
chlorek amonowy, NH4Cl, czysty analitycznie:	38,5 g,
fosforan monosodowy diwodny, NaH2PO4.2H2O, czysty analitycznie:	33,4 g,
fosforan monopotasowy, KH2PO4, czysty analitycznie:	8,5 g,
fosforan dipotasowy, K2HPO4, czysty analitycznie:	21,75 g.

Mieszanina służy zarówno jako pożywka, a także jako system buforowy.

1.6.1.2. U r z ą d z e n i a

Szklane zbiorniki o pojemności czterµech litrów (np. zbiorniki cylindryczne).

Mieszadło ze szklanym lub metalowym mieszakiem na odpowiednim trzonku (mieszak powinien obracać się około 5–10 cm ponad dnem zbiornika). W zamian można użyć magnetycznego mieszaka o długości trzonka 7–10 cm.

Szklana probówka o średnicy wewnętrznej 2–4 mm w celu doprowadzenia powietrza. Otwór probówki powinien być umieszczony około 1 cm ponad dnem zbiornika.

Wirówka (około 3 550 g).

Miernik pH.

Miernik rozpuszczonego tlenu.

Papierowe filtry.

▼B

Urządzenie do filtracji membrany.

Filtry membranowe, wielkość poru 0,45 μm. Filtry membranowe są odpowiednie w przypadku gdy potwierdzone jest, że nie przepuszczają węgla, ani nie wchłaniają substancji w fazie filtracji.

Sprzęt analityczny do określania składu węgla organicznego i chemicznego zapotrzebowania tlenu.

1.6.1.3. Przygotowanie inokulum bakteryjnego

Aktywny szlam pochodzący z biologicznej oczyszczalni ścieków jest oczyszczany przez (wielokrotnie) odwirowywanie lub klarowanie wodą testową (powyżej).

Aktywny szlam musi być we właściwym stanie. Taki szlam uzyskać można z właściwie pracującej oczyszczalni ścieków. W celu uzyskania różnorodnych gatunków lub szczepów bakterii można zmieszać inokulat pochodzący z różnych źródeł (np. różnych oczyszczalni ścieków, ekstraktów gleby, wód rzecznych itd.). Mieszaninę należy oczyszczać w sposób opisany powyżej.

W celu dokonania kontroli aktywnych szlamów, zob. „Kontrola funkcjonalna, poniżej".

1.6.1.4. Przygotowanie roztworów testowych

Do zbiornika używanego w badaniu należy dodać 500 ml wody testowej, 2,5 ml/litr mineralnej pożywki i aktywny szlam w ilości odpowiadającej 0,2–1,0 g/litr suchej masy w ostatecznej mieszaninie. Dodać wystarczającą ilość roztworu podstawowego substancji przeznaczonej do badania, tak aby stężenie DOC w wysokości 50–400 mg/litr dało mieszaninę końcową. Odpowiednie wartości COD wynoszą 100–1 000 mg/litr. Przygotować wodę testową o ogólnej objętości jednego do czterech litrów. Wybór całkowitej ilości wody zależy od liczby próbek, mających być pobrane do określenia DOC lub COD oraz ilości koniecznej do przeprowadzenia procedury analitycznej.

Zazwyczaj ilość dwóch litrów uważana jest za wystarczającą. Zakłada się co najmniej jeden kontrolny zbiornik próbki ślepej w celu przeprowadzania badania równoległego z każdą serią; taki zbiornik zawiera jedynie aktywowany szlam i mineralną pożywkę składającą się z wody testowej o takiej samej ilości całkowitej, jak w zbiornikach używanych do badania.

1.6.2. *Przeprowadzenie badania*

Naczynia testowe są wytrząsane przy użyciu mieszadeł magnetycznych lub tradycyjnych (śmigłowych) w warunkach rozproszonego oświetlenia bądź w ciemności, w temperaturze 20–25 °C. Napowietrzanie jest dokonywane powietrzem pod ciśnieniem, czyszczonym za pomocą bawełnianego filtra oraz tryskawki, jeżeli konieczne. Nie należy dopuścić do osiadania szlamu, a stężenie tlenu nie może obniżyć się poniżej 2 mg/litr.

Wartość pH należy kontrolować w regularnych odstępach czasu (np. codziennie) i dostosować do poziomu pH 7–8 w razie konieczności.

▼B

Straty spowodowane parowaniem są uzupełniane tuż przed każdorazowym pobieraniem próbek wodą dejonizowaną lub destylowaną, w wymaganej ilości. Należy zaznaczyć poziom płynu na zbiorniku przed rozpoczęciem badania. Nowe znaki nanosi się po każdorazowym pobieraniu próbek (bez napowietrzania i mieszania). Pierwsze próbki zawsze pobierane są na trzy godziny po rozpoczęciu badania w celu wykrycia absorpcji materiału testowego przez aktywny szlam.

Eliminacja materiału testowego następuje po określeniu DOC lub COD dokonywanym raz dziennie lub w innych regularnych odstępach czasu. Próbki ze zbiornika testowego oraz z próbką ślepą filtrowane są przez dokładnie oczyszczony filtr papierowy. Pierwsze 5 ml przefiltrowanej substancji testowej jest odrzucane. Szlamy trudne do przefiltrowania mogą być wcześniej usunięte przez 10-minutowe odwirowywanie. Oznaczenia DOC i COD dokonuje się co najmniej dwukrotnie. Badanie przeprowadza się przez okres 28 dni.

Uwaga: Mętne próbki filtrowane są przez filtry membranowe. Filtry membranowe nie mogą uwalniać ani wchłaniać żadnego materiału organicznego.

Funkcjonalna kontrola aktywnego szlamu

Zbiornik zawierający znaną substancję należy prowadzić równolegle z każdą badaną serią w celu kontroli funkcjonalnej wydajności aktywnego szlamu. W tym celu przydatny jest dietylenoglikol.

Przystosowanie

Jeżeli analizy przeprowadzane są w stosunkowo krótkich odstępach czasu (np. raz dziennie), przystosowanie można łatwo rozpoznać po krzywej degradacji (zob. wykres 2). Dlatego też niniejszego badania nie należy rozpoczynać bezpośrednio przed weekendem.

W przypadku gdy dostosowanie wystąpi na końcu okresu badania, badanie możne zostać przedłużone do chwili zakończenia degradacji.

Uwaga: Jeżeli konieczna jest szersza wiedza w zakresie zachowania dostosowanego szlamu, ten sam aktywny szlam należy poddać działaniu tego samego materiału testowego zgodnie z następującą procedurą:

Należy wyłączyć mieszadło oraz napowietrzacz i umożliwić osadzenie się aktywowanego szlamu. Zebrać supernatan, nalać dwie litry wody testowej, mieszać przez 15 minut i umożliwić ponowne osadzenie się szlamu. Po ponownym zebraniu supernatanu należy użyć pozostały szlam w celu powtórzenia badania z tym samym materiałem testowym zgodnie z 1.6.1.4 i 1.6.2 powyżej. Można również wyizolować aktywny szlam przez odwirowanie zamiast osadzenia.

Dostosowany szlam można zmieszać ze świeżym szlamem w celu uzyskania stężenia o zawartości 0,2–1 g suchej masy/litr.

▼B

Środki analityczne

Zazwyczaj próbki filtrowane są przez starannie umyty filtr papierowy (do mycia należy użyć wodę dejonizowaną).

Próbki, które wciąż pozostają mętne należy filtrować przez filtry membranowe (0,45 μm).

Stężenie DOC ustala się dwukrotnie na podstawie filtrowanej próbki (pierwsze 5 ml należy odrzucić) za pomocą przyrządu TOC. Jeżeli nie można dokonać analizy filtratu w tym samym dniu, należy przechować go w chłodziarce do następnego dnia. Nie zaleca się dłuższego okresu przechowywania.

Stężenie DOC ustala się w filtratach próbki za pomocą analitycznego określenia COD na podstawie procedury ustalonej w poz. bibliograficznej (2), poniżej.

2. **DANE I ANALIZA**

Stężenia DOC i/lub COD ustala się co najmniej dwukrotnie w próbkach zgodnie z 1.6.2, powyżej. Degradacja w czasie T obliczana jest zgodnie ze wzorem (z definicjami) podanym zgodnie z 1.2, powyżej.

Stopień degradacji zaokrąglany jest do najbliższej wartości procentowej. Stopień degradacji uzyskany po zakończeniu badania odnotowywany jest jako „Biodegradacja w teście Zan-Wellens".

Uwaga: W przypadku uzyskania całkowitej degradacji przed zakończeniem okresu badania oraz gdy taki wynik potwierdzony jest drugą analizą przeprowadzoną w dniu następnym, wówczas badanie może zostać zakończone.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— początkowe stężenie substancji testowej,

— wszelkie inne informacje oraz wyniki badań dotyczące substancji testowej, substancji odniesienia jeżeli zostały użyte, i próbki ślepej,

— stężenie po trzech godzinach,

— krzywa biodegradacji wraz z opisem,

— data i lokalizacja pobrania próbek badanych organizmów, status dostosowania, użyte stężenie itd.,

— naukowe powody jakichkolwiek zmian procedury badania.

3.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Ubytek DOC (COD), stopniowo następujący przez okres badania obejmujący dni lub tygodnie, wskazuje, iż substancja testowa ulega biodegradacji.

▼B

Jednakże fizyko-chemiczna adsorpcja może w niektórych przypadkach odegrać istotną rolę, a sygnalizowane jest to w przypadku całkowitego lub częściowego ubytku początkowego w ciągu pierwszych trzech godzin, a różnica między grupą kontrolną i badanymi supernatanami pozostaje na niespodziewanie niskim poziomie.

Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań jeżeli istnieje potrzeba rozróżnienia między biodegradacją (lub częściową biodegradacją) a adsorpcją.

Można to osiągnąć na wiele sposobów, ale najbardziej przekonujące jest użycie supernatantu lub szlamu jako inokulum w teście podstawowym (najlepiej teście respirometrycznym).

Substancje testowe powodujące wysoki, nieadsorpcyjny ubytek DOC (COD) w niniejszym badaniu należy uważać za substancje wpływające biodegradacyjnie. Częściowy, nieadsorpcyjny ubytek oznacza, iż substancja chemiczna ulega biodegradacji co najmniej w pewnym stopniu. Niski lub zerowy poziom ubytku DOC (COD) może być spowodowany zahamowaniem aktywności drobnoustrojów przez substancję testową, co można również wykryć przez rozpad lub utratę szlamu, dającego mętne supernatany. Badanie należy powtórzyć, wykorzystując niskie stężenie substancji testowej.

Użycie specyficznej dla danego związku metody analitycznej lub substancji testowej znakowanej izotopem węgla ^{14}C zwiększa czułość metody. W przypadku związków znakowanych ^{14}C, odzyskanie $^{14}CO_2$ potwierdzi, że zaszła biodegradacja.

W przypadku podawania wyników początkowej biodegradacji, jeżeli możliwe, należy wyjaśnić zmianę w budowie chemicznej, która powoduje utratę reakcji macierzystej substancji testowej.

Potwierdzenie metody analitycznej musi być dostarczone wraz z reakcją, która zaszła w próbce ślepej.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD, Paryż, 1981, *Wytyczne Badania* 302 B, decyzja Rady C(81) 30 wersja ostateczna.

(2) Załącznik V C.9 Degradacja: Chemiczne zapotrzebowanie tlenu, dyrektywa Komisji 84/449/EWG (Dz.U. L 251 z 19.9.1984, s. 1).

▼B

Dodatek

PRZYKŁAD ANALIZY

Związek organiczny:	4-kwas etoksybenzoesowy
Teoretyczne stężenie substancji testowej:	600 mg/l
Teoretyczne DOC:	390 mg/l
Inokulum	Oczyszczalnia ścieków z
Stężenie:	1 gram suchej masy/litr
Poziom dostosowania:	Niedostosowany
Analiza:	Ustalenie DOC
Ilość próbki:	3 ml
Substancja kontrolna:	Dietylenoglikol
Toksyczność związku chemicznego:	Brak skutków toksyczności poniżej 1 000 mg/l Użyty test: Test probówkowy fermantacji

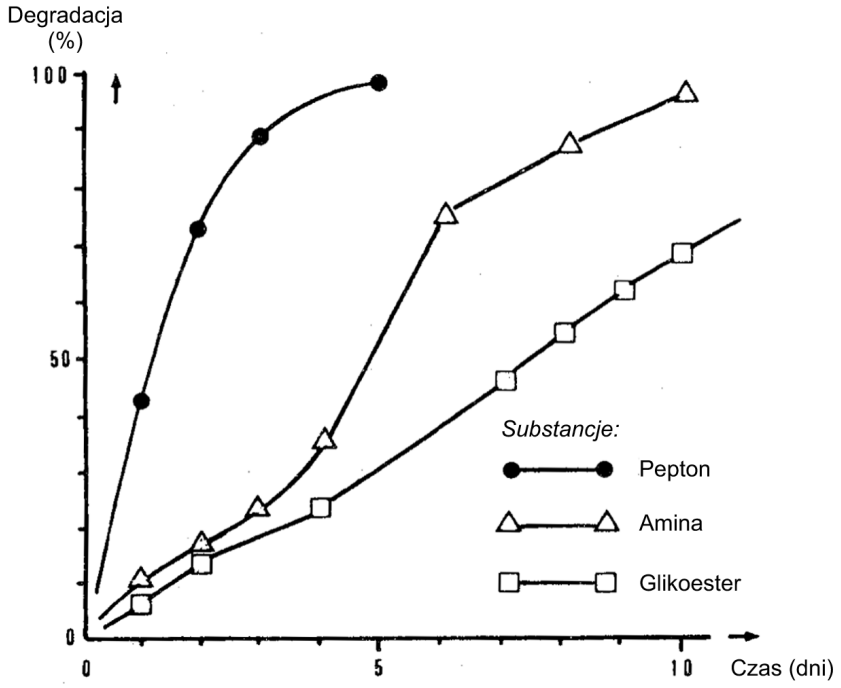
Czas	Substancja kontrolna				Substancja testowa		
	Próba ślepa DOC (1) mg/l	DOC (1) mg/l	DOC netto mg/l	Degradacja %	DOC (1) mg/l	DOC netto mg/l	Degradacja %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 godziny	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dzień	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dni	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dni	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dni	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dni	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dni	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dni	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dni	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Średnie wartości potrójnych degradacji.

▼B

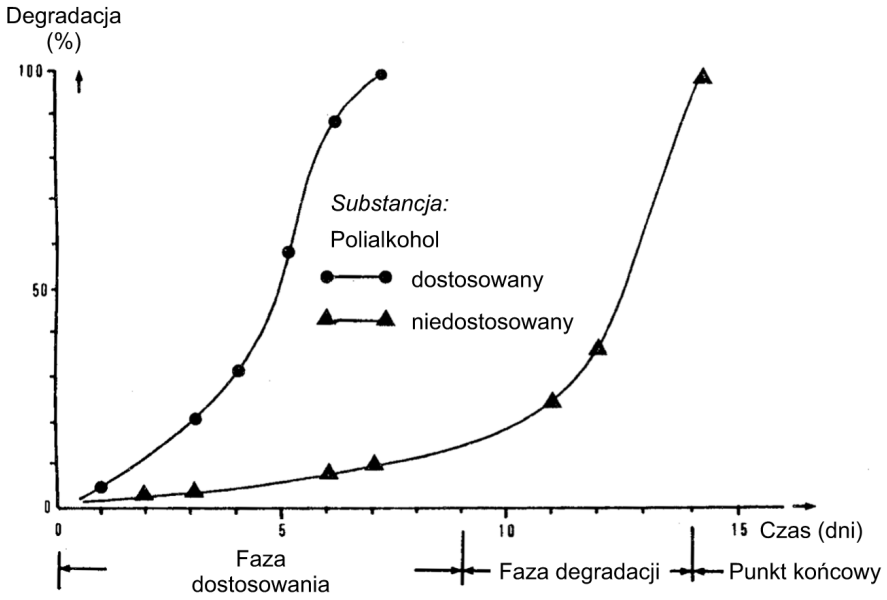
Wykres 1

Przykłady krzywych biodegradacji



Wykres 2

Przykłady dostosowania szlamu



▼M4

C.10. **SYMULACYJNE BADANIE W WARUNKACH TLENOWYCH W OCZYSZCZALNIACH ŚCIEKÓW: C.10-A: ZESTAWY OSADU CZYNNEGO - C.10-B: BIOFILMY**

C.10-A: Zestawy osadu czynnego

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 303 (2001). W latach 50. XX w. zdano sobie sprawę, że nowo wprowadzane środki powierzchniowo czynne powodują nadmierne pienienie w oczyszczalniach ścieków i w rzekach. Nie były w pełni usuwane w drodze rozkładu tlenowego i w niektórych przypadkach ograniczały usuwanie substancji organicznych. To spowodowało podjęcie wielu badań na temat tego, jak środki powierzchniowo czynne mogłyby być usuwane ze ścieków i czy nowe substancje chemiczne wytwarzane w produkcji przemysłowej poddają się oczyszczaniu. W tym celu wykorzystano zestawy modelowe odpowiadające dwóm głównym typom tlenowego oczyszczania biologicznego ścieków (zestaw osadu czynnego i zestaw ze złożem zraszanym). Niepraktycznym i bardzo kosztownym rozwiązaniem byłaby dystrybucja każdej nowej substancji chemicznej i monitorowanie dużych oczyszczalni ścieków, nawet w kontekście lokalnym.

WSTĘPNE ROZWAŻANIA

Zestawy osadu czynnego

2. Opisano modelowe zestawy osadu czynnego w zakresie wielkości od 300 ml do ok. 2 000 ml. Niektóre były bardzo podobne do instalacji normalnej wielkości i zawierały osadniki, z których osad przepompowywany był z powrotem do zbiornika napowietrzającego, podczas gdy inne nie obejmowały osadników, np. Swisher (1). Rozmiar przyrządu jest efektem kompromisu: z jednej strony musi on być wystarczająco duży, by możliwe było przeprowadzenie z powodzeniem działań mechanicznych oraz zapewnienie wystarczającej objętości próbek bez wpływu na całość procedur, z drugiej strony zaś nie może wymagać nadmiernej przestrzeni i ilości materiałów.

3. Dwa przyrządy stosowane powszechnie i z powodzeniem to zestawy Husmanna (2) i zestawy naczyń porowatych (3) (4), używane początkowo przy badaniu środków powierzchniowo czynnych; opisano je w niniejszej metodzie badawczej. Z powodzeniem używano również innych przyrządów, np. Eckenfeldera (5). Z powodu dość wysokiego kosztu i wysiłków związanych ze stosowaniem tego badania symulacyjnego jednocześnie poddano analizie prostsze i tańsze badania przesiewowe, zawarte obecnie w rozdziale C.4 A-F niniejszego załącznika (6). Doświadczenia z wieloma środkami powierzchniowo czynnymi oraz innymi substancjami chemicznymi pokazały, że te, które przeszły z powodzeniem badania przesiewowe (szybko biodegradowalne), ulegały również degradacji w badaniu symulacyjnym. Niektóre substancje, które nie przeszły z powodzeniem badań przesiewowych, przeszły badania naturalnej biodegradowalności (rozdziały C.12 (7) oraz C.19 (8) niniejszego załącznika), jednak tylko niektóre z tej ostatniej grupy uległy degradacji w badaniu symulacyjnym, podczas gdy te substancje, które nie przeszły z powodzeniem badania naturalnej podatności na biodegradację, nie uległy degradacji w badaniach symulacyjnych (9) (10) (11).

4. Badania przeprowadzane przy jednym układzie warunków działania są wystarczające do niektórych celów; wyniki wyraża się jako wartość procentową usunięcia badanej substancji chemicznej lub rozpuszczonego węgla organicznego (DOC). Opis takiego badania podany jest w niniejszej metodzie badawczej. Jednakże w przeciwieństwie do wcześniejszej wersji niniejszego rozdziału, w której opisano tylko jeden typ przyrządu do oczyszczania ścieków syntetycznych w trybie połączonym przy zastosowaniu względnie prostej metody degradacji osadu, w niniejszym tekście

▼M4

przedstawiono szereg możliwości. Opisano alternatywy dla typu przyrządu, trybu działania oraz usuwania ścieków i osadu po degradacji. Niniejszy tekst ściśle odpowiada tekstowi ISO 11733 (12), który został dokładnie przeanalizowany w trakcie przygotowań, choć metody nie poddano badaniu międzylaboratoryjnemu.

5. Dla innych celów konieczna jest dokładniejsza znajomość stężenia badanej substancji chemicznej w odpływie, a do tego potrzebny jest model bardziej ekstensywny. Przykładowo, współczynnik degradacji osadu musi być dokładniej kontrolowany przez cały dzień oraz w ciągu całego czasu badania i konieczne jest przeprowadzenie badań na zestawach przy szeregu różnych współczynników degradacji. W przypadku najbardziej szczegółowej metody badania należy również przeprowadzić w dwóch lub trzech różnych temperaturach: metoda taka została opisana przez Bircha (13) (14) i streszczona w dodatku 6. Jednakże obecna wiedza nie wystarcza do stwierdzenia, który model kinetyczny ma zastosowanie do biodegradacji substancji chemicznych w oczyszczaniu ścieków i ogólnie w środowisku wodnym. Zastosowanie kinetyki Monoda, podane w dodatku 6 jako przykład, jest ograniczone do substancji chemicznych obecnych w ilości co najmniej 1 mg/l, ale w opinii niektórych badaczy nawet to musi zostać uzasadnione. Badania przy stężeniach bardziej dokładnie odzwierciedlających stężenia występujące w ściekach zostały wskazane w dodatku 7, ale takie badania, podobnie jak te zawarte w dodatku 6, przedstawione są w dodatkach, a nie jako osobne metody badawcze.

Filtry

6. Dużo mniej uwagi poświęcono modelom złoży zraszanych, być może dlatego, że są bardziej niewygodne i większe niż instalacje z osadem czynnym. Gerike i in. stworzyli zestawy złoży zraszanych i przeprowadzili na nich działania w trybie połączonym (15). Filtry te były dość duże (wysokość 2 m, pojemność 60 l) i do każdego z nich potrzeba było aż 2 l/h ścieków. Baumann i in. (16) stworzyli symulację złoży zraszanych wkładając paski z „wełny” poliestrowej do 1-metrowych rur (o średnicy wewnętrznej 14 mm) po wcześniejszym zanurzeniu pasków przez 30 min. w stężonym osadzie czynnym. Badana substancja chemiczna jako jedyne źródło C w roztworze soli mineralnych była przepuszczana przez pionową rurę, po czym oceniano biodegradację w oparciu o pomiary DOC w odpływie i CO_2 w powstającym gazie.

7. Biofiltry symulowano w inny sposób (15); na wewnętrzne powierzchnie obracających się rur nachylonych pod niewielkim kątem w stosunku do poziomu podawano ścieki (ok. 250 ml/h) zawierające badaną substancję chemiczną i pozbawione jej, a zgromadzony odpływ analizowano pod kątem zawartości DOC lub właściwej badanej substancji chemicznej.

ZASADA BADANIA

8. Celem niniejszej metody jest określenie eliminacji oraz pierwotnej lub ostatecznej biodegradacji rozpuszczalnych w wodzie organicznych substancji chemicznych przez mikroorganizmy tlenowe w stale działającym systemie badawczym symulującym proces osadu czynnego. Ulegająca łatwej biodegradacji pożywka organiczna oraz badana organiczna substancja chemiczna są źródłami węgla i energii dla mikroorganizmów.

9. Dwa stale działające zestawy badawcze (instalacje z osadem czynnym lub naczynia porowate) pracują jednocześnie w identycznych warunkach, które odpowiadają celowi badania. Średni hydrauliczny czas retencji wynosi normalnie 6 h, a średni wiek osadu (czas retencji osadu) od 6 do 10 dni. Osad oczyszczany jest przy wykorzystaniu jednej z dwóch metod, badana substancja chemiczna jest normalnie dodawana w stężeniu pomiędzy 10 mg/l rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) a 20 mg/l DOC do wcieku (pożywki organicznej) tylko w jednym zestawie. Drugi zestaw wykorzystywany jest jako zestaw kontrolny do określenia biodegradacji pożywki organicznej.

▼M4

10. W często pobieranych próbkach odpływów określa się poziom DOC – co jest lepszym rozwiązaniem – lub poziom chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) oraz stężenie badanej substancji chemicznej (o ile jest to konieczne) w odpływie z zestawu pobierającego badaną substancję chemiczną przy wykorzystaniu analizy właściwej. Przyjmuje się, że różnice pomiędzy stężeniami DOC lub ChZT w zestawie badawczym i zestawie kontrolnym wynikają z działania badanej substancji chemicznej lub jej organicznych metabolitów. Różnicę tę porównuje się z powstałym we wcieku wskutek dodania badanej substancji chemicznej stężeniem DOC lub ChZT w celu określenia eliminacji badanej substancji chemicznej.

11. Biodegradację można na ogół odróżnić od bioadsorpcji dzięki dokładnemu zbadaniu krzywej czasu eliminacji, a wynik można zazwyczaj potwierdzić, stosując badanie szybkiej biodegradacji przy wykorzystaniu aklimatyzowanego inokulum z zestawu, do którego dodaje się badaną substancję chemiczną.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

12. Właściwości badanej substancji chemicznej związane z czystością, rozpuszczalnością w wodzie, lotnością i adsorpcją powinny być znane, tak aby możliwa była prawidłowa interpretacja wyników. Na ogół nie jest możliwe badanie lotnych ani nierozpuszczalnych substancji chemicznych, chyba że podjęte zostaną specjalne środki (zob. dodatek 5). Należy również znać strukturę chemiczną, a przynajmniej wzór empiryczny, tak aby można było obliczyć wartości teoretyczne lub sprawdzić zmierzone wartości parametrów, np. teoretyczne zapotrzebowanie na tlen (TZT), rozpuszczony węgiel organiczny (DOC) oraz chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT).

13. Informacje na temat toksyczności badanej substancji chemicznej dla mikroorganizmów (zob. dodatek 4) mogą być bardzo użyteczne przy wyborze odpowiednich stężeń do badania i mogą być niezbędne dla prawidłowej interpretacji niskich wartości biodegradacji.

POZIOMY PROGOWE

14. W pierwotnym zastosowaniu niniejszego badania symulacyjnego (potwierdzającego) w odniesieniu do pierwotnej biodegradacji środków powierzchniowo czynnych konieczne jest usunięcie ponad 80 % danej substancji chemicznej, aby dany środek mógł zostać wprowadzony do obrotu. Jeśli poziom 80 % nie zostanie osiągnięty, dane badanie symulacyjne (potwierdzające) może zostać zastosowane, a środek powierzchniowo czynny może zostać wprowadzony do obrotu, tylko jeśli ponad 90 % danej substancji chemicznej zostanie usunięte. W przypadku substancji chemicznych zasadniczo nie mówi się o przejściu badania z powodzeniem/bez powodzenia, a uzyskana wartość procentowa usunięcia może zostać wykorzystana w aproksymacji prawdopodobnego stężenia w środowisku, stosowanej przy ocenach zagrożenia chemicznego stwarzanego przez substancje chemiczne. Wyniki układają się zazwyczaj w schemat „wszystko albo nic”. W licznych badaniach czystych substancji chemicznych stwierdzono wartość procentową usunięcia DOC na poziomie > 90 % w ponad trzech czwartych, a > 80 % w ponad 90 % substancji, które wykazywały jakikolwiek znaczący poziom biodegradowalności.

15. Stosunkowo niewiele substancji chemicznych (np. środków powierzchniowo czynnych) obecnych jest w ściekach w stężeniach (ok. 10 mg C/l) wykorzystywanych w niniejszym badaniu. Niektóre substancje chemiczne mogą w tych stężeniach mieć działanie hamujące, podczas gdy kinetyka usuwania innych może być utrudniona przy niskich stężeniach. Bardziej dokładnej oceny degradacji można byłoby dokonać przy wykorzystaniu zmodyfikowanych metod i realistycznie niskich stężeń badanej substancji chemicznej, a zgromadzone dane mogłyby zostać wykorzystane do obliczenia stałych kinetycznych. Jednakże niezbędne techniki eksperymentalne nie zostały jeszcze w pełni zwalidowane, a modele kinetyczne opisujące reakcje biodegradacji nie zostały jeszcze ustanowione (zob. dodatek 7).

▼M4

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

16. Dla zapewnienia prawidłowego przeprowadzenia procedury eksperymentu warto od czasu do czasu, wraz z substancjami badanymi, testować substancje chemiczne, których zachowanie jest znane. Substancje takie to na przykład kwas adypinowy, 2-fenylofenol, 1-naftol, kwas 2,2'-bifenylodikarboksylowy, kwas 1-naftalenokarboksylowy itp. (9) (10) (11).

ODTWARZALNOŚĆ WYNIKÓW BADAŃ

17. Istnieje dużo mniej sprawozdań z badań symulacyjnych niż z badań szybkiej biodegradowalności. Odtwarzalność pomiędzy (równoczesnymi) powtórzeniami jest na wysokim poziomie (w zakresie 10–15 %) w przypadku substancji chemicznych zdegradowanych o 80 % lub więcej, ale w przypadku słabiej zdegradowanych substancji chemicznych występuje większe zróżnicowanie. Ponadto w przypadku niektórych substancji chemicznych o wartości granicznej odnotowano bardzo zróżnicowane wyniki (np. 10 % i 90 %) przy różnych okazjach w ciągu 9 tygodni dopuszczonych w badaniu.

18. W przypadku wyników otrzymanych przy wykorzystaniu obydwu rodzajów przyrządów różnice były nieznaczne, ale niektóre substancje chemiczne ulegały degradacji w większym zakresie i bardziej dokładnie w przypadku ścieków domowych niż ścieków syntetycznych OECD.

OPIS METODY BADAWCZEJ

Przyrząd

Układ badawczy

19. Układ badawczy dla jednej substancji chemicznej składa się z zestawu badawczego i zestawu kontrolnego; jednak w przypadku przeprowadzania tylko konkretnych analiz (biodegradacja pierwotna) konieczny jest tylko zestaw badawczy. Jeden zestaw kontrolny może być wykorzystywany przy kilku zestawach badawczych z tymi samymi lub różnymi badanymi substancjami chemicznymi. W przypadku połączenia (dodatek 3) każdy zestaw badawczy musi mieć własny zestaw kontrolny. Układem badawczym może być instalacja z osadem czynnym, zestaw Husmanna (dodatek 1, rysunek 1) lub naczynie porowate (dodatek 1, rysunek 2). W obydwu przypadkach konieczne są odpowiedniej wielkości zbiorniki magazynujące na wcieki i odpływy oraz pompy dozujące wciek i roztwór badanej substancji chemicznej, zmieszane lub osobno.

20. Każdy zestaw osadu czynnego składa się z naczynia napowietrzającego o znanej pojemności ok. 3 l osadu czynnego oraz osadnika (osadnika wtórnego) o pojemności ok. 1,5 l; pojemności te można w pewnym zakresie zmieniać korygując wysokość osadnika. Naczynia różnej wielkości są dopuszczalne, jeśli poddawane są porównywalnym obciążeniom hydraulicznym. Jeśli nie jest możliwe utrzymanie temperatury w pomieszczeniu badawczym w planowanym zakresie, zaleca się zastosowanie naczyń z płaszczem wodnym o kontrolowanej temperaturze wody. Do transportu osadu czynnego z osadnika do naczynia napowietrzającego wykorzystuje się podnośnik powietrzny lub pompę dozującą działającą w systemie stałym lub przerywanym w regularnych odstępach czasu.

21. System naczyń porowatych składa się z wewnętrznego porowatego cylindra o stożkowym dnie umieszczonego w nieco większym naczyniu o tym samym kształcie, ale wykonanym z nieprzepuszczalnego tworzywa sztucznego. Odpowiednim materiałem na naczynie porowate jest porowaty polietylen o maksymalnej średnicy porów 90 μm i grubości 2 mm. Oddzielenie osadu od pożywki organicznej następuje wskutek różnicowego przepływu przez porowate ściany. Odpływy gromadzą się w przestrzeni pierścienia, z której przepływają do naczynia magazynującego. Nie następuje sedymentacja, a więc nie ma zwrotu osadu. Cały układ może być zamontowany w kontrolowanej termostatycznie kąpieli wodnej. Na początkowych etapach naczynia porowate mogą ulegać

▼M4

zablokowaniu i powodować przelewanie. W takiej sytuacji należy wymienić zablokowaną wkładkę na czystą, najpierw zlewając osad z naczynia do czystego kubła i usuwając zablokowaną wkładkę. Po wytarciu nieprzepuszczalnego cylindra zewnętrznego należy umieścić w nim czystą wkładkę i ponownie wprowadzić osad do naczynia. Cały osad, który przylgnął do bocznych części zablokowanej wkładki, również należy ostrożnie zdjąć i przenieść. Zablokowane naczynia należy wyczyścić najpierw za pomocą małej dyszy wodnej w celu usunięcia pozostałego osadu, następnie poprzez zanurzenie kolejno w rozcieńczonym roztworze podchlorynu sodu i w wodzie, a na koniec dokładnie spłukać wodą.

22. Do napowietrzenia osadu w naczyniach napowietrzających obydwu układów konieczne są odpowiednie techniki, na przykład zastosowanie spiekanych kostek (kamieni napowietrzających) i sprężonego powietrza. Powietrze oczyszcza się w razie potrzeby poprzez przepuszczenie przez odpowiedni filtr i płukanie. Przez układ musi przejść wystarczająca ilość powietrza, tak by możliwe było zachowanie warunków tlenowych i utrzymanie kłaczków osadu w zawieszeniu przez cały czas trwania badania.

Przyrząd do filtrowania lub wirówka

23. Urządzenie do filtrowania próbek z filtrami membranowymi o odpowiedniej porowatości (nominalna średnica otworu 0,45 μm), które adsorbują rozpuszczalne organiczne substancje chemiczne i uwalniają węgiel organiczny w minimalnym stopniu. W przypadku stosowania filtrów uwalniających węgiel organiczny należy zmyć filtry dokładnie gorącą wodą w celu usunięcia wymywalnego węgla organicznego. Alternatywnie można zastosować wirówkę mogącą osiągnąć 40 000 m/s^2.

Sprzęt do wykonywania analiz

24. Przyrząd konieczny do oznaczenia:

— DOC (rozpuszczonego węgla organicznego) i TOC (całkowitego węgla organicznego) lub ChZT (chemicznego zapotrzebowania na tlen),

— konkretnej substancji chemicznej, o ile jest to konieczne,

— zawiesin, pH, stężenia tlenu w wodzie,

— temperatury, kwasowości i zasadowości,

— amonu, azotynu i azotanu, jeśli badanie przeprowadzane jest w warunkach nitryfikacyjnych.

Woda

25. Woda wodociągowa, zawierająca mniej niż 3 mg/l DOC. Należy określić zasadowość, jeśli nie jest jeszcze znana.

26. Woda dejonizowana, zawierająca mniej niż 2 mg/l DOC.

Pożywka organiczna

27. Jako pożywkę organiczną można stosować ścieki syntetyczne, ścieki domowe lub mieszaninę obydwu tych typów. Wykazano (11) (14), że zastosowanie wyłącznie ścieków domowych często skutkuje zwiększoną wartością procentową usunięcia DOC, a nawet umożliwia usunięcie i biodegradację niektórych substancji chemicznych, które nie ulegają biodegradacji w przypadku zastosowania syntetycznych ścieków OECD. Ponadto stałe lub przerywane dodawanie ścieków domowych często stabilizuje osad czynny, w tym jego kluczowy potencjał – dobre osadzanie. Dlatego też zaleca się stosowanie ścieków domowych. Należy zmierzyć stężenie DOC lub ChZT w każdej nowej partii pożywki organicznej. Kwasowość lub zasadowość pożywki organicznej powinna być znana. Pożywka organiczna może wymagać dodania odpowiedniego bufora (wodorowęglanu sodu lub diwodorofosforanu potasu), jeżeli jej poziom kwasowości lub zasadowości jest niski, w celu utrzymania pH w naczyniu napowietrzającym w trakcie badania na poziomie ok. 7,5 ± 0,5. Ilość dodawanego bufora oraz moment jego dodania należy określić indywidualnie w każdym przypadku. Jeśli mieszaniny dodawane są w sposób stały lub przerywany, poziom DOC (lub ChZT) mieszaniny musi być utrzymywany na mniej więcej tym samym poziomie, np. poprzez rozcieńczanie wodą.

▼M4

Ścieki syntetyczne

28. Rozpuścić w każdym litrze wody wodociągowej: pepton, 160 mg; ekstrakt mięsa, 110 mg; mocznik, 30 mg; bezwodny wodorofosforan potasu (K_2HPO_4), 28 mg; chlorek sodu (NaCl), 7 mg; dwuwodny chlorek wapnia ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; siedmiowodny siarczan magnezu ($Mg_2SO_4.7H_20$), 2 mg. Ten ściek syntetyczny OECD jest mieszaniną przykładową i daje średnie stężenie DOC we wcieku na poziomie ok. 100 mg/l. Alternatywnie można wykorzystać inne składy o zbliżonym stężeniu DOC, które bardziej odpowiadają prawdziwym ściekom. Jeśli wymagany jest mniej stężony wciek, należy przy wykorzystaniu wody wodociągowej rozcieńczyć ściek syntetyczny, na przykład w stosunku 1:1, tak aby uzyskać stężenie ok. 50 mg/l. Taki słabszy wciek umożliwi lepszy wzrost organizmów nitryfikujących i modyfikację tę należy stosować w przypadku badania symulacji oczyszczalni ścieków wykorzystujących nitryfikację. Taki ściek syntetyczny można przygotować w wodzie destylowanej w postaci skoncentrowanej i przechowywać w temperaturze ok. 1 °C przez maksymalnie jeden tydzień. W razie potrzeby należy go rozcieńczyć wodą wodociągową. (Ta pożywka nie jest satysfakcjonująca, np. stężenie azotu jest bardzo wysokie, a zawartość węgla dość niska, ale nie można zaproponować niczego lepszego poza ewentualnym dodaniem większej ilości fosforanu jako bufora i dodatkowego peptonu).

Ścieki domowe

29. Wykorzystać świeżo osadzone ścieki zbierane codziennie z oczyszczalni ścieków przyjmującej głównie ścieki domowe. Ścieki powinny być zbierane przed wstępną sedymentacją z przelewu osadnika wstępnego lub z materiału doprowadzanego do instalacji osadu czynnego i zasadniczo nie powinny zawierać cząstek gruboziarnistych. Ścieki można stosować po przechowywaniu ich przez kilka dni (ale zasadniczo nie dłużej niż siedem dni) w temperaturze ok. 4 °C, po sprawdzeniu, czy DOC (lub ChZT) nie zmniejszył się znacząco (tzn. o mniej niż 20 %) w trakcie przechowywania. Aby zmniejszyć zakłócenia w układzie, przed zastosowaniem należy skorygować DOC (lub ChZT) każdej nowej partii do odpowiedniej stałej wartości, np. poprzez rozcieńczenie wodą wodociągową.

Osad czynny

30. Pobrać osad czynny do inokulacji ze zbiornika napowietrzającego dobrze funkcjonującej oczyszczalni ścieków lub z zestawu osadu czynnego o skali laboratoryjnej służącego do oczyszczania głównie ścieków domowych.

Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej

31. W przypadku substancji chemicznych o odpowiedniej rozpuszczalności przygotować roztwory podstawowe o właściwych stężeniach (np. 1 do 5 g/l) w wodzie dejonizowanej lub w części mineralnej ścieków syntetycznych. (W przypadku nierozpuszczalnych i lotnych substancji chemicznych zob. dodatek 5). Określić DOC i całkowity węgiel organiczny (TOC) roztworu podstawowego i powtórzyć pomiary przy każdej nowej partii. Jeśli różnica pomiędzy DOC a TOC jest większa niż 20 %, sprawdzić rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w wodzie. Porównać DOC lub stężenie badanej substancji chemicznej mierzone za pomocą specyficznej analizy roztworu podstawowego o wartości nominalnej w celu stwierdzenia, czy odzyskiwanie jest wystarczające (zazwyczaj można spodziewać się wartości > 90 %). Sprawdzić, w szczególności w przypadku dyspersji, czy można wykorzystać DOC jako parametr analityczny, czy też możliwe jest zastosowanie wyłącznie techniki analitycznej specyficznej dla badanej substancji chemicznej. W przypadku dyspersji konieczne jest odwirowanie próbek. W każdej nowej partii zmierzyć DOC, ChZT lub poziom badanej substancji chemicznej za pomocą specyficznej metody analitycznej.

▼M4

32. Określić pH roztworu podstawowego. Wartości krańcowe wskazują, że dodanie substancji chemicznej może mieć wpływ na pH osadu czynnego w układzie badawczym. W takim przypadku w celu uzyskania pH o wartości 7 ± 0,5 należy zneutralizować roztwór podstawowy dodając niewielkie ilości nieorganicznego kwasu lub zasady, ale unikając strącania badanej substancji chemicznej.

PROCEDURA

33. Opisano procedurę dla zestawów osadu czynnego; należy ją nieco dostosować na potrzeby układu naczyń porowatych.

Przygotowanie inokulum

34. Inokulować układ badawczy na początku badania albo osadem czynnym, albo inokulum zawierającym małe stężenie mikroorganizmów. Przechowywać napowietrzone inokulum w temperaturze pokojowej do momentu wykorzystania; zużyć w ciągu 24 h. W pierwszym przypadku pobrać próbkę osadu czynnego z naczynia napowietrzającego dobrze działającej biologicznej oczyszczalni ścieków lub z zestawu osadu czynnego o skali laboratoryjnej przyjmującego głównie ścieki domowe. Jeśli konieczna jest symulacja warunków nitryfikacyjnych, pobrać osad z oczyszczalni ścieków wykorzystującej nitryfikację. Określić stężenie zawiesin i – w razie potrzeby – skoncentrować osad poprzez sedymentację w taki sposób, by zminimalizować ilość dodawaną do układu badawczego. Zapewnić początkowe stężenie suchej masy na poziomie ok. 2,5 g/l.

35. W drugim przypadku użyć między 2 ml/l a 10 ml/l odpływu z przydomowej biologicznej oczyszczalni ścieków jako inokulum. Dla uzyskania jak najbardziej zróżnicowanych gatunków bakterii można dodać inokula z różnych innych źródeł, na przykład wody powierzchniowej. W takim przypadku osad czynny w układzie badawczym rozwinie się i urośnie.

Dawkowanie pożywki organicznej

36. Sprawdzić, czy pojemniki na wciek i odpływ oraz rurki z naczyń na wciek i do naczyń na odpływ są całkowicie czyste, aby uniemożliwić wzrost mikroorganizmów na początku i w trakcie trwania badania. Złożyć układy badawcze w pomieszczeniu o kontrolowanej temperaturze (zazwyczaj w zakresie 20–25 °C) lub wykorzystać zestawy w płaszczu wodnym. Przygotować odpowiednią ilość koniecznej pożywki organicznej (pkt 27–29). Wstępnie napełnić naczynie napowietrzające i osadnik pożywką organiczną i dodać inokulum (pkt 34, 35). Rozpocząć napowietrzanie w taki sposób, by osad był utrzymywany w zawieszeniu i w stanie tlenowym, rozpocząć dozowanie wcieku i recykling osadzonego osadu. Dawkować pożywkę organiczną ze zbiorników magazynujących do zbiorników napowietrzających (pkt 20, 21) zestawów badawczych i kontrolnych i zebrać odpływy w podobnych zbiornikach magazynujących. W celu uzyskania normalnego 6-godzinnego hydraulicznego czasu retencji pożywkę organiczną pompuje się w tempie 0,5 l/h. W celu potwierdzenia tego tempa mierzyć dzienną ilość dozowanej pożywki organicznej, odnotowując zmniejszenie ilości pożywki w zbiornikach magazynujących. Inne tryby dozowania konieczne są do określenia skutków przerywanego uwalniania i „uderzeniowego” podawania substancji chemicznych.

37. Jeśli pożywka organiczna przygotowywana jest do użytku przez okres dłuższy niż 1 dzień, konieczne jest schładzanie w temperaturze ok. 4 °C lub stosowanie innych odpowiednich metod konserwacji w celu zapobieżenia wzrostowi mikroorganizmów i biodegradacji poza zestawami badawczymi (pkt 29). W przypadku stosowania ścieków syntetycznych można przygotować i przechowywać w temperaturze ok. 4 °C stężony roztwór podstawowy (np. 10-krotność normalnego stężenia, pkt 28). Taki roztwór podstawowy można zmieszać przed użyciem z odpowiednią ilością wody wodociągowej; alternatywnie, można go wpompować bezpośrednio przy jednoczesnym osobnym podawaniu wody wodociągowej.

▼M4

Dawkowanie badanej substancji chemicznej

38. Dodać odpowiednią ilość roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej (pkt 31) do naczynia magazynującego z wciekiem lub dawkować bezpośrednio oddzielną pompą do naczynia napowietrzającego. Normalne średnie stężenie badawcze wcieku powinno wynosić pomiędzy 10 mg/l a 20 mg/l DOC, przy czym górna wartość nie może przekraczać 50 mg/l. Jeśli rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w wodzie jest niska lub prawdopodobne jest wystąpienie efektów toksycznych, zmniejszyć stężenie do 5 mg/l DOC lub nawet mniejszej wartości, ale tylko jeśli dostępna i wykorzystywana jest odpowiednia szczególna metoda analityczna (zdyspergowane badane substancje chemiczne, które są słabo rozpuszczalne w wodzie, mogą być dodawane przy użyciu specjalnych technik dawkowania, zob. dodatek 5).

39. Rozpocząć dodawanie badanej substancji chemicznej po okresie, w którym system ustabilizował się i wydajnie usuwa DOC z pożywki organicznej (ok. 80 %). Przed dodaniem badanej substancji chemicznej ważne jest sprawdzanie, czy wszystkie zestawy działają tak samo wydajnie; jeśli nie, skutecznym rozwiązaniem jest zazwyczaj zmieszanie poszczególnych porcji osadu i ponowne podanie równych ilości do poszczególnych zestawów. Jeśli wykorzystywane jest inokulum z (około) 2,5 g/l (suchej masy) osadu czynnego, badana substancja chemiczna może być dodawana od początku badania, ponieważ bezpośrednie dodawanie wzrastających ilości od samego początku przynosi korzyść w postaci lepszego dostosowywania się osadu czynnego do badanej substancji chemicznej. Bez względu na sposób dodawania badanej substancji chemicznej zaleca się, by odpowiednie natężenie przepływu lub ilości w naczyniach magazynujących były mierzone w regularnych odstępach czasu.

Postępowanie z osadem czynnym

40. Stężenie stałego osadu czynnego stabilizuje się zazwyczaj pomiędzy wartościami granicznymi w trakcie badania, niezależnie od zastosowanego inokulum, w zakresie pomiędzy 1 a 3 g/l (suchej masy), w zależności od jakości i stężenia pożywki organicznej, warunków działania, charakteru obecnych mikroorganizmów i wpływu badanej substancji chemicznej.

41. Mierzyć zawiesiny w naczyniach napowietrzających co najmniej raz w tygodniu i usuwać nadwyżkę osadu w celu utrzymania stężenia na poziomie pomiędzy 1 g/l a 3 g/l (suchej masy) lub kontrolować średni wiek osadu utrzymując go na stałym poziomie, zazwyczaj w zakresie pomiędzy 6 a 10 dni. Jeśli wybierze się na przykład 8-dniowy czas retencji osadu, codziennie należy usuwać 1/8 objętości osadu czynnego ze zbiornika napowietrzającego i odrzucać go. Działania te należy przeprowadzać codziennie, lub – w miarę możliwości – przy wykorzystaniu automatycznej pompy działającej w sposób przerywany. Utrzymanie stężenia zawiesiny na stałym poziomie lub pomiędzy bliskimi wartościami granicznymi nie pozwala na zachowanie stałego czasu retencji osadu, który jest zmienną operacyjną określającą wartość stężenia badanej substancji chemicznej w odpływie.

42. W trakcie trwania badania usuwać co najmniej raz dziennie cały osad przylegający do ścian naczynia napowietrzającego i osadnika, tak by osad pozostawał w stanie zawieszonym. Regularnie kontrolować i oczyszczać wszystkie rurki w celu zapobieżenia wzrostowi biofilmu. Przenosić poddany sedymentacji osad z osadnika z powrotem do naczynia napowietrzającego, najlepiej przy wykorzystaniu pompy pracującej w sposób przerywany. W układzie naczyń porowatych nie zachodzi recykling, ale należy zadbać, by włożyć czyste naczynia, zanim poziom w naczyniu znacząco wzrośnie (pkt 21).

43. W zestawach Husmanna może występować słaba sedymentacja i degradacja osadu. Sytuacji tej można zaradzić poprzez zastosowanie co najmniej jednego z poniżej wymienionych działań, jednocześnie w zestawach badawczych i kontrolnych:

— można dodawać w regularnych odstępach, np. co tydzień, świeży osad lub flokulant (np. 50 g/l $FeCl_3$ w ilości 2 ml/naczynie), lecz należy zadbać, by nie nastąpiła żadna reakcja czy też wytrącanie osadu w wyniku reakcji pomiędzy badaną substancją chemiczną a $FeCl_3$,

▼M4

— podnośnik powietrzny można zastąpić pompą perystaltyczną, co umożliwia przepływ recyrkulacyjny osadu mniej więcej równoważny przepływowi wcieku i pozwala na rozwinięcie strefy beztlenowej w osadzie poddanym sedymentacji (geometria podnośnika powietrznego ogranicza minimalne natężenie przepływu zwróconego osadu do ok. 12-krotności natężenia przepływu wcieku),

— można pompować osad w sposób przerywany z osadnika do naczynia napowietrzającego (np. 5 min. co 2,5 h) w celu zwrotu 1 l/h do 1,5 l/h,

— można wykorzystać nietoksyczną substancję przeciwpianotwórczą w minimalnym stężeniu w celu zapobieżenia stracie wskutek pienienia (np. olej silikonowy),

— można przepuścić powietrze przez osad w osadniku w krótkich uderzeniowych porcjach (np. przez 10 sek., co godzinę),

— można w regularnych odstępach podawać pożywkę organiczną do naczynia napowietrzającego (np. przez 3–10 min co godzinę).

Pobieranie próbek i analiza

44. Mierzyć w regularnych odstępach stężenie rozpuszczonego tlenu, temperaturę i pH osadu czynnego w naczyniach napowietrzających. Zapewnić stałą dostępność wystarczającej ilości tlenu (> 2 mg/l) i temperaturę w odpowiednim zakresie (normalnie od 20 °C do 25 °C). Utrzymać pH na poziomie 7,5 ± 0,5, dawkując niewielkie ilości nieorganicznej zasady lub kwasu do naczynia napowietrzającego lub do wcieku, lub zwiększając pojemność buforową pożywki organicznej (zob. pkt 27). Jeśli zachodzi nitryfikacja, wytwarzany jest kwas, utlenienie 1 mg N powoduje wytworzenie odpowiednika ok. 7 mg CO_3–. Częstotliwość pomiarów zależy od mierzonych parametrów oraz stabilności systemu i możliwe jest występowanie różnic pomiędzy pomiarami dziennymi i tygodniowymi.

45. Zmierzyć DOC lub ChZT we wciekach do naczyń kontrolnych i badawczych. Zmierzyć stężenie badanej substancji chemicznej we wcieku w zestawie badawczym przy wykorzystaniu analizy właściwej lub oszacować je ze stężenia w roztworze podstawowym (pkt 31), wykorzystanej pojemności i ilości ścieków dawkowanych do zestawu badawczego. Zaleca się obliczenie stężenia badanej substancji chemicznej w celu zmniejszenia zmienności danych dotyczących stężenia.

46. Pobrać odpowiednie próbki z zebranego odpływu (np. 24-godzinna próbka zbiorcza) i przefiltrować je przez membranę o wielkości porów 0,45 μm lub odwirować je przy ok. 40 000 m/s^2 przez ok. 15 min. Jeśli filtrowanie sprawia trudności, należy zastosować wirowanie. Określić DOC lub ChZT co najmniej dwukrotnie w celu zmierzenia ostatecznej biodegradacji i, o ile to konieczne, pierwotnej biodegradacji, w drodze analizy specyficznej dla badanej substancji chemicznej.

47. Zastosowanie ChZT może spowodować powstanie trudności analitycznych przy niskich stężeniach i dlatego zalecane jest wyłącznie, jeśli wykorzystuje się odpowiednio wysokie stężenie badawcze (ok. 30 mg/l). Ponadto w przypadku mocno adsorbujących substancji chemicznych zaleca się, by ilość adsorbowanej substancji chemicznej w osadzie była mierzona przy wykorzystaniu techniki analitycznej specyficznej dla badanej substancji chemicznej.

48. Częstotliwość pobierania próbek zależy od oczekiwanej długości trwania badania. Zalecana jest częstotliwość trzy razy w tygodniu. Jeśli zestawy działają wydajnie, należy przeznaczyć okres od 1 do maksymalnie 6 tygodni po wprowadzeniu badanej substancji chemicznej na osiągnięcie stanu ustalonego. W celu oceny wyniku badania uzyskać co najmniej 15 ważnych wartości w fazie plateau (pkt 59) trwającej normalnie 3 tygodnie. Badanie można zakończyć po osiągnięciu odpowiedniego stopnia eliminacji (np. > 90 %) i uzyskaniu tych 15 wartości odpowiadających analizom przeprowadzonym w każdym dniu roboczym przez 3 tygodnie. Normalnie okres trwania badania nie powinien przekraczać 12 tygodni po dodaniu badanej substancji chemicznej.

▼M4

49. Jeśli osad ulegnie nitryfikacji oraz jeśli zbadany ma być wpływ badanej substancji chemicznej na nitryfikację, przeanalizować co najmniej raz w tygodniu próbki z odpływu zestawów badawczych i kontrolnych pod kątem soli amonowych lub azotynów i azotanów.

50. Wszystkie analizy, szczególnie określenie poziomu azotu, należy przeprowadzać tak szybko, jak to tylko możliwe. Jeśli analizy muszą być przesunięte w czasie, próbki należy przechowywać w temperaturze ok. 4 °C w ciemności, w pełnych i szczelnie zamkniętych butelkach. Jeśli próbki muszą być przechowywane przez ponad 48 h, zabezpieczyć je poprzez zamrożenie, zakwaszenie (np. stosując 10 ml/l roztworu kwasu siarkowego o stężeniu 400 g/l) lub dodanie odpowiedniej substancji toksycznej (np. 20 ml/l roztworu chlorku rtęci(II) o stężeniu 10 g/l). Zadbać, by technika zabezpieczenia nie miała wpływu na wyniki analizy.

Łączenie zestawów badawczych

51. Jeśli stosowane jest łączenie (dodatek 3), wymieniać codziennie tę samą ilość osadu czynnego (150 ml do 1 500 ml w przypadku naczyń napowietrzających zawierających 3 litry płynu) pomiędzy naczyniami napowietrzającymi zestawu badawczego i jego zestawu kontrolnego. Jeśli badana substancja chemiczna adsorbuje silnie do osadu, wymienić tylko supernatant osadników. W obydwu przypadkach zastosować współczynnik korygujący do obliczenia wyników badania (pkt 55).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Obróbka wyników

52. Obliczyć wartość procentową eliminacji DOC lub ChZT badanej substancji chemicznej w odniesieniu do każdej oceny w czasie, wykorzystując równanie:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

gdzie:

D_t = % eliminacji DOC lub ChZT w czasie t,

C_s = DOC lub ChZT we wcieku w wyniku działania badanej substancji chemicznej, najlepiej oszacowane z roztworu podstawowego (mg/l),

E = mierzona wartość DOC lub ChZT w badanym odpływie w czasie t (mg/l),

E_o = mierzona wartość DOC lub ChZT w kontrolnym odpływie w czasie t (mg/l).

53. Stopień eliminacji DOC lub ChZT w pożywce organicznej w zestawie kontrolnym to informacja przydatna przy ocenianiu aktywności biodegradacyjnej osadu czynnego w trakcie badania. Obliczyć wartość procentową eliminacji z równania:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

gdzie:

D_B = % eliminacji DOC lub ChZT pożywki organicznej w zestawie kontrolnym w czasie t,

C_M = DOC lub ChZT pożywki organicznej we wcieku kontrolnym (mg/l).

▼M4

Opcjonalnie można obliczyć wartość procentową eliminacji DOC lub ChZT wskutek dodania pożywki organicznej oraz badanej substancji chemicznej w zestawie badawczym z równania:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

gdzie:

D_T = % eliminacji DOC lub ChZT całości wcieku badawczego,

C_T = DOC lub ChZT całości wcieku badawczego lub wartość obliczona z roztworów podstawowych (mg/l).

54. Obliczyć usunięcie badanej substancji chemicznej, jeśli pomiaru dokonywano przy wykorzystaniu swoistej metody analitycznej przy każdym pomiarze w czasie, z równania:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

gdzie:

D_{ST} = % pierwotnej eliminacji badanej substancji chemicznej w czasie t,

S_i = mierzone lub szacowane stężenie badanej substancji chemicznej w badanym wcieku (mg/l),

S_e = mierzone stężenie badanej substancji chemicznej w badanym wcieku w czasie t (mg/l).

55. Jeśli wykorzystano tryb połączenia, wyrównać rozcieńczenie badanej substancji chemicznej w naczyniu napowietrzającym przez wymianę osadu z zastosowaniem współczynnika korygującego (zob. dodatek 3). Jeśli zastosowano średni hydrauliczny czas retencji trwający 6 h i wymianę połowy objętości osadu czynnego w naczyniu napowietrzającym, stwierdzone dzienne wartości eliminacji (D_t, pkt 52) muszą zostać skorygowane w celu otrzymania prawdziwego stopnia eliminacji – D_{tc} – badanej substancji chemicznej z równania:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Prezentacja wyników badania

56. Przedstawić w postaci wykresu wartość procentową eliminacji D_t (lub D_{tc}) oraz D_{st}, jeśli jest dostępna, w stosunku do czasu (zob. dodatek 2). Z kształtu krzywej eliminacji badanej substancji chemicznej (*per se* lub jako DOC) można wyciągnąć pewne wnioski co do procesu usuwania.

Adsorpcja

57. Jeśli od początku badania obserwuje się wysoką eliminację DOC, badana substancja chemiczna jest prawdopodobnie eliminowana w drodze adsorpcji do stałego osadu czynnego. Można to udowodnić poprzez określenie adsorbowanej badanej substancji chemicznej w drodze analizy właściwej. Wysoki poziom eliminacji DOC adsorbowalnych substancji chemicznych podczas całego badania nie jest typowy; zazwyczaj na początku usuwanie zachodzi w dużym stopniu, który następnie spada do równomiernego poziomu. Jednak jeśli adsorbowalna substancja chemiczna spowodowała jakiś rodzaj przystosowania populacji bakterii, poziom eliminacji DOC badanej substancji chemicznej ulegałby stopniowemu wzrostowi i osiągał wysoki poziom plateau.

▼M4

Faza zastoju

58. Tak samo jak w przypadku statycznych badań przesiewowych, wiele badanych substancji chemicznych wymaga fazy zastoju przed wystąpieniem pełnej biodegradacji. W fazie zastoju następuje przystosowanie lub adaptacja bakterii prowadzących proces degradacji przy jednoczesnym prawie całkowitym braku usuwania badanej substancji chemicznej; następnie zachodzi wstępny wzrost tych bakterii. Zakłada się, że ta faza kończy się, a zaczyna faza degradacji, kiedy następuje usunięcie ok. 10 % wstępnej ilości badanej substancji chemicznej (po adsorpcji, o ile takowa wystąpi). Faza zastoju jest często bardzo zmienna i słabo odtwarzalna.

Faza plateau

59. Faza plateau na krzywej eliminacji w teście ciągłym definiowana jest jako ta faza, w której następuje maksymalna degradacja. Faza plateau powinna trwać co najmniej 3 tygodnie i należy w jej trakcie dokonać około 15 ważnych pomiarów wartości.

Średni stopień eliminacji badanej substancji chemicznej

60. Obliczyć średnią wartość z wartości eliminacji (D_t) badanej substancji chemicznej w fazie plateau. W zaokrągleniu do najbliższej liczby całkowitej (1 %) stanowi ona stopień eliminacji badanej substancji chemicznej. Zaleca się również obliczenie 95 % przedziału ufności średniej wartości.

Eliminacja pożywki organicznej

61. Przedstawić w postaci wykresu wartość procentową eliminacji DOC lub ChZT pożywki organicznej w zestawie kontrolnym (D_B) w stosunku do czasu. Wskazać średni stopień eliminacji w taki sam sposób jak w odniesieniu do badanej substancji chemicznej (pkt 60).

Wskazywanie na biodegradację

62. Jeśli substancja chemiczna nie adsorbuje w znaczącym stopniu do osadu czynnego, a krzywa eliminacji ma typowy kształt krzywej biodegradacji z fazami zastoju, degradacji i plateau (pkt 58, 59), zmierzoną eliminację można bezpiecznie przypisać biodegradacji. Jeśli zaszło znaczne wstępne usuwanie, badanie symulacyjne nie może dokonywać rozróżnienia pomiędzy procesami eliminacji biologicznej i abiotycznej. W takich przypadkach, a także w innych sytuacjach, kiedy zachodzi wątpliwość co do biodegradacji (np. jeśli występuje odpędzanie), przeanalizować adsorbowane badane substancje chemiczne lub przeprowadzić dodatkowe statyczne badania biodegradacji w oparciu o parametry wyraźnie wskazujące na procesy biologiczne. Takie badania to metoda pobierania tlenu (rozdz. C.4 D, E i F niniejszego załącznika (6)), badanie z pomiarem wytwarzania dwutlenku węgla (rozdział C.4 C niniejszego załącznika (6)) lub metoda ISO pomiaru dwutlenku węgla w przestrzeni nad roztworem (18) wykorzystująca preinkubowane inokulum z badania symulacyjnego. Jeśli zmierzone zostało zarówno usunięcie DOC, jak i usunięcie właściwej substancji chemicznej, znaczące różnice (pierwsza wartość jest niższa niż druga) pomiędzy wartościami procentowymi wskazują obecność w odpływach pośrednich produktów organicznych, które mogą być trudniejsze w degradacji niż pierwotna substancja chemiczna.

Ważność wyników badania

63. Informacje na temat normalnej biodegradacji inokulum uzyskuje się, jeśli określi się stopień eliminacji pożywki organicznej (pkt 53) w zestawie kontrolnym. Badanie uznaje się za ważne, jeśli stopień eliminacji DOC lub ChZT w zestawie kontrolnym (zestawach kontrolnych) wynosi > 80 % po dwóch tygodniach i nie zaobserwowano żadnych nietypowych zjawisk.

▼M4

64. Jeśli zastosowano szybko biodegradowalną (referencyjną) substancję chemiczną, stopień biodegradacji (D_t, pkt 52) powinien wynieść > 90 %.

65. Jeśli badanie przeprowadzane jest w warunkach nitryfikujących, średnie stężenie w odpływach powinno wynosić < 1 mg/l azotu w postaci amoniaku i < 2 mg/l azotu w postaci azotynu.

66. Jeśli te kryteria (pkt 63–65) nie są spełnione, powtórzyć badanie, wykorzystując inokulum z innego źródła, zbadać substancję odniesienia i dokonać przeglądu wszystkich procedur eksperymentu.

Sprawozdanie z badania

67. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— dane identyfikacyjne,

— charakter fizyczny i w razie potrzeby własności fizykochemiczne.

Warunki badania

— typ układu badawczego; wszelkie modyfikacje w przypadku badania nierozpuszczalnych i lotnych substancji chemicznych,

— typ pożywki organicznej,

— proporcja i charakter ścieków przemysłowych obecnych w ściekach, jeśli są znane,

— inokulum: charakter i miejsce (miejsca) pobierania próbek, stężenie i wszystkie operacje przygotowania wstępnego,

— roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej: zawartość DOC i ChZT; sposób przygotowywania, jeśli jest to zawiesina; wykorzystane stężenie badawcze; powody zastosowania wartości DOC poza zakresem 10–20 mg/l; metoda dodawania; data pierwszego dodania; ewentualne zmiany,

— średni wiek osadu i średni hydrauliczny czas retencji; metoda degradacji osadu; metoda likwidowania pęcznienia, utraty osadu itp.,

— zastosowane techniki analityczne,

— temperatura badania,

— cechy pęcznienia osadu, indeks objętościowy osadu (SVI), zawartość zawiesin w komorze osadu czynnego (MLSS),

— wszelkie odchylenia od standardowych procedur i wszelkie okoliczności, które mogły mieć wpływ na wyniki.

Wyniki badania

— wszystkie mierzone dane (DOC, ChZT, analizy właściwe, pH, temperatura, stężenie tlenu, zawiesiny, substancje chemiczne zawierające azot, w stosownych przypadkach,

— wszystkie obliczone wartości D_t (lub D_{tc}), D_B, D_{St} otrzymane w formie tabelarycznej i krzywe eliminacji,

— informacje na temat faz zastoju i faz plateau, długość trwania badania, stopień eliminacji badanej substancji chemicznej i pożywki organicznej w zestawie kontrolnym wraz z informacjami statystycznymi i potwierdzeniami biodegradowalności i ważności badania,

— omówienie wyników.

▼**M4**

BIBLIOGRAFIA:

(1) Swisher RD (1987). „Surfactant Biodegradation", wydanie drugie, Marcel Dekker Inc. Nowy Jork, 1085 s.

(2) Rząd niemiecki (1962). Rozporządzenie w sprawie degradowalności detergentów w środkach myjących i czyszczących. Bundesgesetzblatt, część 1, nr 49: 698-706.

(3) Painter HA i King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, Zjednoczone Królestwo.

(4) Painter HA i 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) Rozdział C.4 niniejszego załącznika: Oznaczenie szbkiej biodegradowalności.

(7) Rozdział C.12 niniejszego załącznika: Biodegradacja – zmodyfikowane badanie SCAS.

(8) Rozdział C.19 niniejszego załącznika: Oszacowanie współczynnika adsorpcji (K_{OC}) na glebie i w osadzie ściekowym przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

(9) Gerike P i Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3: 157-173.

(10) Gerike P i Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter HA i Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. s. 113-138, [w]: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. [red.] Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; zmieniony 2004). Oznaczanie eliminacji i biodegradacji związków organicznych w środowisku wodnym – Test symulacyjny z osadem czynnym.

(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 i 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 i 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. s. 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.

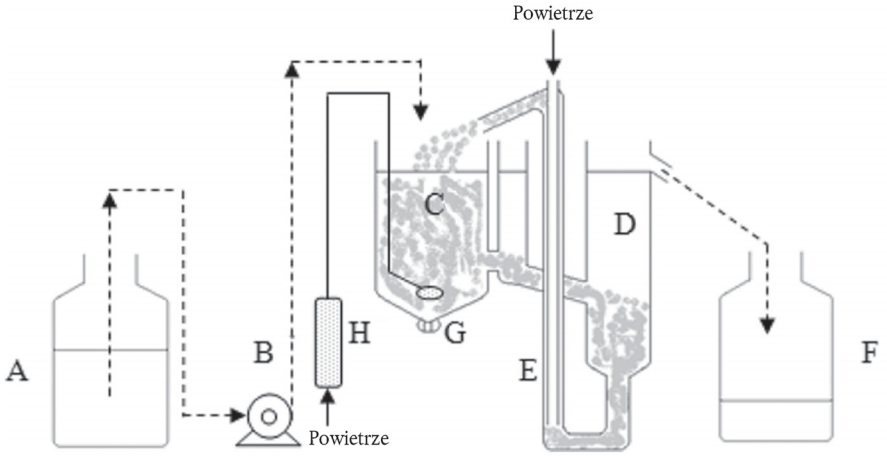
▼**M4**

Dodatek 1

Rysunek 1

Oprzyrządowanie stosowane do oceny biodegradowalności

Zestaw Husmanna

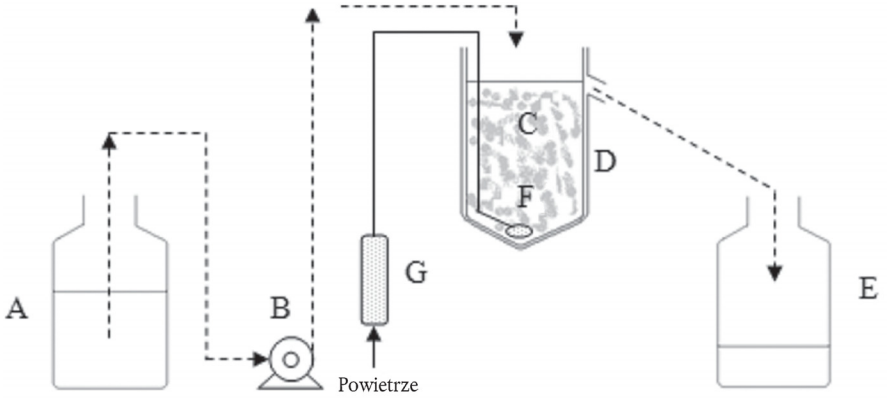


A.	Naczynie magazynujące	E.	Podnośnik powietrzny
B.	Pompa dozująca	F.	Naczynie do zbierania odpływu
C.	Komora napowietrzania (pojemność 3 l)	G.	Napowietrzacz
D.	Osadnik	H.	Miernik przepływu powietrza

Rysunek 2

Oprzyrządowanie stosowane do oceny biodegradowalności

Naczynie porowate

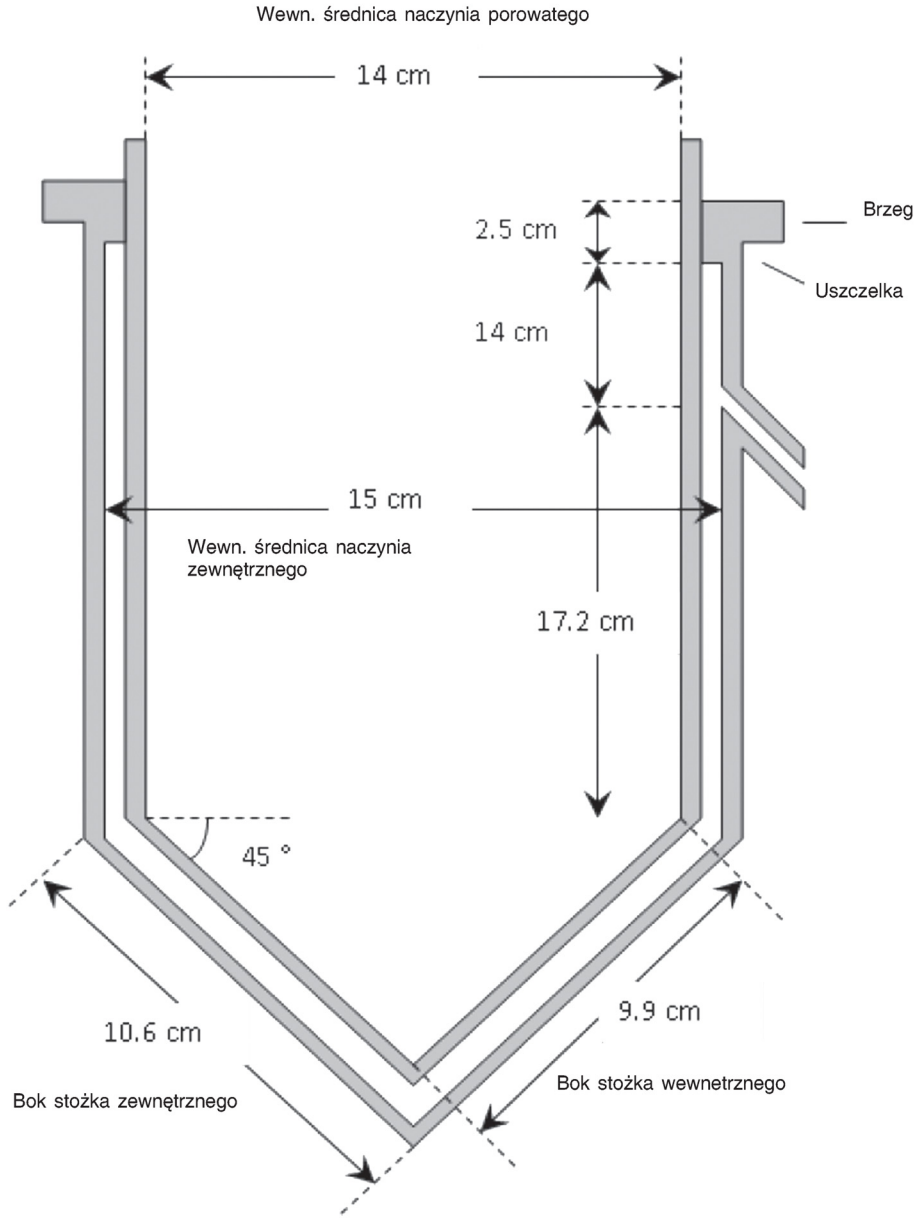


A.	Naczynie magazynujące	F.	Naczynie do zbierania odpływu
B.	Pompa dozująca	F.	Dyfuzor
C.	Porowate naczynie do napowietrzania		
D.	Zewnętrzne nieprzepuszczalne naczynie	G.	Miernik przepływu powietrza

▼**M4**

Rysunek 3

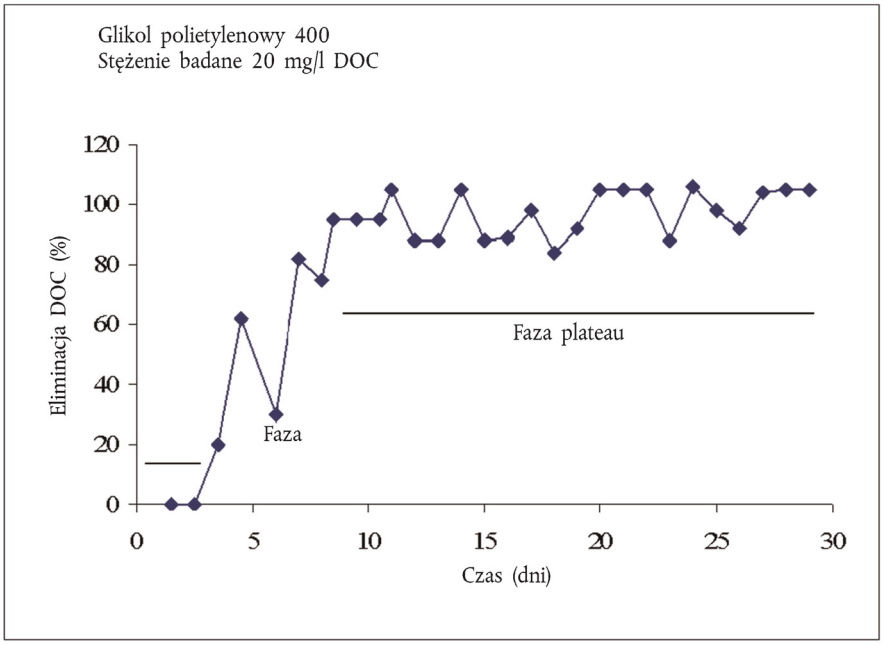
Szczegóły budowy 3-litrowego naczynia porowatego do napowietrzania



▼**M4**

Dodatek 2

Przykład krzywej eliminacji



▼M4

Dodatek 3

[INFORMACYJNY]

ŁĄCZENIE ZESTAWÓW BADAWCZYCH

W celu zrównoważenia populacji bakteryjnych w osadzie w zestawie badawczym, do którego wprowadza się ścieki i badaną substancję chemiczną, oraz w zestawie kontrolnym, do którego wprowadza się tylko ścieki, wprowadzono codzienną wymianę osadu (1). Procedurę tę nazwano łączeniem, a metoda znana jest jako zestawy łączone. Pierwotnie łączenie stosowano do zestawów osadu czynnego Husmanna, ale używano go również do zestawów z naczyniami porowatymi (2) (3). Nie odnotowano znaczących różnic w wynikach zestawów niełączonych i łączonych, zarówno w przypadku zestawów Husmanna, jak i zestawów naczyń porowatych, tak więc wydatkowanie czasu i energii na łączenie zestawów nie przynosi żadnych korzyści.

Wymiana osadu może pozornie powodować znaczące usuwanie, ponieważ część badanej substancji chemicznej jest przenoszona, a stężenia badanej substancji w odpływie badanym i kontrolnym stają się niemal równe. Dlatego też konieczne jest stosowanie współczynników korygujących, które uzależnione są od wymienianej frakcji i średniego hydraulicznego czasu retencji. Opublikowano szczegółowe informacje na temat wyliczeń (1).

Obliczyć skorygowany stopień eliminacji DOC lub ChZT używając ogólnego wzoru:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

gdzie:

D_{tc} = skorygowany % eliminacji DOC lub ChZT,

D_t = określony % eliminacji DOC lub ChZT,

a = wymieniona frakcja objętości zestawów osadu czynnego,

r = średni hydrauliczny czas retencji (h).

Jeśli na przykład połowa pojemności naczynia napowietrzającego jest wymieniana (a = 0,5), a średni hydrauliczny czas retencji wynosi 6 h, prawidłowy wzór to:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

BIBLIOGRAFIA

(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 i Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. s. 113-138, [w]: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. [red.] 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, Zjednoczone Królestwo.

▼M4

Dodatek 4

OCENA HAMOWANIA OSADU CZYNNEGO

Procedura z udziałem badanych substancji chemicznych

1. Substancja chemiczna (lub ściek) mogą nie ulegać degradacji ani usuwaniu w badaniu symulacyjnym i mogą wręcz mieć wpływ hamujący na mikroorganizmy w osadzie. Inne substancje chemiczne ulegają biodegradacji w niskich stężeniach, ale mają działanie hamujące w stężeniach wyższych (hormeza). Działanie hamujące może ujawnić się na wcześniejszym etapie lub może zostać stwierdzone dzięki zastosowaniu badania toksyczności przy użyciu inokulum podobnego lub identycznego jak to stosowane w badaniu symulacyjnym (1). Metody te to hamowanie pobierania tlenu (rozdział C.11 niniejszego załącznika (2) oraz ISO 8192(3)) lub hamowanie wzrostu organizmów w osadzie (ISO 15522 (4)).

2. W badaniu symulacyjnym wszelkie działanie hamujące wyraża się jako różnica poziomu rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) lub chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) pomiędzy odpływem z naczynia badawczego i z kontrolnego przekraczająca ilość DOC w substancji dodanej jako badana substancja chemiczna. Inaczej mówiąc, wartość procentowa usunięcia DOC (i biochemicznego zapotrzebowania na tlen BZT, chemicznego zapotrzebowania na tlen ChZT lub NH^{+}_{4}) w poddawanej działaniu pożywce organicznej zmniejszy się w obecności badanej substancji chemicznej. Jeśli to nastąpi, należy powtórzyć badanie, zmniejszając stężenie badanej substancji chemicznej do momentu osiągnięcia poziomu, na którym nie występuje hamowanie, i ewentualnie dalej zmniejszając stężenie do momentu biodegradacji badanej substancji chemicznej. Jednakże jeśli badana substancja chemiczna (lub ściek) ma negatywny wpływ na proces we wszystkich badanych stężeniach, sugeruje to, że substancja jest trudna do oczyszczania biologicznego, lub też że jest ono niemożliwe, jednak warto powtórzyć badanie przy wykorzystaniu osadu czynnego z innego źródła lub poddać osad bardziej stopniowemu przystosowaniu.

3. Z kolei jeśli badana substancja chemiczna ulega bioeliminacji przy pierwszej próbie przeprowadzenia badania symulacyjnego, jej stężenie należy zwiększyć, jeśli konieczne jest ustalenie, czy dana substancja chemiczna może mieć działanie hamujące.

4. Przy próbach określenia stopnia hamowania należy pamiętać, że populacja w osadzie czynnym może ulec zmianie, wskutek czego z biegiem czasu mikroorganizmy mogą rozwinąć tolerancję na substancję chemiczną o działaniu hamującym.

5. Obliczenie stopnia hamowania:

Ogólną procentową wartość usunięcia R_o BZT, DOC, ChZT itp. w zestawach testowych i kontrolnych można wyliczyć z:

$$R_o = 100(I - E)/I\ \%$$

gdzie:

I = stężenie we wcieku BZT, DOC, ChZT itp. w naczyniach badawczych i kontrolnych (mg/l),

E = odpowiednie stężenia w odpływie.

I i E należy skorygować o DOC w odniesieniu do badanej substancji chemicznej w zestawach badawczych, w przeciwnym wypadku obliczenia procentowej wartości hamowania będą niepoprawne.

▼**M4**

Stopień hamowania wywołanego obecnością badanej substancji chemicznej można obliczyć z:

$$\% \text{ hamowania} = 100(R_c - R_t)/R_c$$

gdzie:

R_c = procentowa wartość usunięcia w naczyniach kontrolnych,

R_t = procentowa wartość usunięcia w naczyniach badawczych.

BIBLIOGRAFIA

(1) Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Rozdział C.11 niniejszego załącznika. Biodegradacja – badanie hamowania oddychania osadów czynnych.

(3) ISO 8192 (2007) Jakość wody – Badanie hamowania zużycia tlenu przez osad czynny do utleniania związków zawierających węgiel i amon.

(4) ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Dodatek 5

Badane substancje chemiczne słabo rozpuszczalne w wodzie – lotne substancje chemiczne

Substancje chemiczne słabo rozpuszczalne w wodzie

Opublikowano do tej pory niewiele raportów z poddawania substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie badaniom symulującym oczyszczanie ścieków (1) (2) (3).

Nie istnieje jedna metoda dyspersji badanej substancji chemicznej, która miałaby zastosowanie do wszystkich nierozpuszczalnych substancji chemicznych. Dwa z czterech typów metod opisywanych w ISO 10634 (4) wydają się odpowiednie do podjęcia prób rozproszenia badanych substancji chemicznych na potrzeby badań symulacyjnych; są to zastosowanie środków emulgujących lub energii ultradźwiękowej. Należy osiągnąć co najmniej 24-godzinne okresy stabilności dyspersji. Odpowiednio ustabilizowane dyspersje znajdujące się w zbiorniku ze stałym mieszaniem (pkt 38) dawkuje się następnie do naczynia napowietrzającego oddzielnie od ścieków domowych (lub syntetycznych).

Jeśli dyspersje są stabilne, zbadać, jak można określić ilość badanej substancji chemicznej w postaci zdyspergowanej. Jest mało prawdopodobne, by odpowiednie było wykorzystanie DOC, zatem należy określić dla badanej substancji chemicznej właściwą metodę analityczną, którą można byłoby stosować do odpływów, części stałych odpływów i osadu czynnego. To, co stanie się z badaną substancją chemiczną w symulacji procesu osadu czynnego, jest wówczas determinowane w fazach ciekłych i stałych. W ten sposób ustalony zostanie „bilans masy” pozwalający określić, czy badana substancja chemiczna uległa biodegradacji. Będzie się to jednak odnosić tylko do biodegradacji pierwotnej. Należy podjąć próbę wykazania ostatecznej biodegradacji poprzez zastosowanie respirometrycznego badania szybkiej biodegradowalności (rozdział C.4 niniejszego załącznika (5) C, F lub D), wykorzystując jako inokulum osad poddany działaniu badanej substancji chemicznej w badaniu symulacyjnym.

Lotne substancje chemiczne

Zastosowanie symulacji oczyszczania ścieków do substancji lotnych jest dyskusyjne i problematyczne. Tak samo jak w przypadku badanych substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie, również na temat badań symulacyjnych z wykorzystaniem lotnych substancji chemicznych opublikowano niewiele raportów. Konwencjonalnego typu przyrząd do mieszania pełnego jest adaptowany poprzez uszczelnienie zbiorników napowietrzających i osadników, pomiar i kontrolę przepływu powietrza przy wykorzystaniu mierników przepływu powietrza oraz przepuszczanie gazu uchodzącego przez pułapki w celu zebrania lotnych substancji organicznych. W niektórych przypadkach wykorzystuje się pompę próżniową do przepuszczania gazu uchodzącego przez „zimną” pułapkę lub pułapkę oczyszczającą zawierającą Tenax i żel silikonowy do analiz metodą chromatografii gazowej. Obecność badanej substancji chemicznej w pułapce można określić analitycznie.

Badanie przeprowadzane jest w dwóch częściach. Zestawy działają najpierw bez osadu – do zbiornika napowietrzającego wpompowuje się tylko ścieki syntetyczne i badaną substancję chemiczną. Próbki wcieku, odpływu i gazu uchodzącego są gromadzone i analizowane pod kątem obecności badanej substancji chemicznej przez kilka dni. Na podstawie zgromadzonych danych można obliczyć wartość procentową (R_{vs}) badanej substancji chemicznej usuniętej z układu.

Następnie przeprowadza się normalne badanie biologiczne (z osadem) w warunkach operacyjnych identycznych do warunków badania odpędzania. Wykonuje się również pomiary DOC lub ChZT w celu sprawdzenia, czy zestawy pracują wydajnie. Od czasu do czasu przeprowadza się analizy mające określić ilość badanej substancji chemicznej we wcieku, odpływie i gazie uchodzącym w pierwszej części badania; po przystosowaniu przeprowadza się częstsze analizy. Na podstawie danych w stanie ustalonym można obliczyć wartość procentową usunięcia badanej substancji chemicznej z fazy ciekłej przy wykorzystaniu wszystkich procesów (R_T) (fizycznych i biologicznych) oraz odsetek (R_V) usunięty z układu.

▼**M4**

Obliczenie:

a) W badaniu niebiologicznym udział procentowy (R_{VP}) badanej substancji chemicznej usuniętej z układu można obliczyć ze wzoru:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

gdzie:

R_{VP} = usunięcie badanej substancji chemicznej poprzez ulatnianie się (%),

S_{VP} = badana substancja chemiczna zgromadzona w pułapce wyrażona jako ekwiwalent stężenia w fazie płynnej (mg/l),

S_{IP} = stężenie badanej substancji chemicznej we wcieku (mg/l).

b) W badaniu biologicznym udział procentowy (R_V) badanej substancji chemicznej usuniętej z układu można obliczyć ze wzoru:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

gdzie:

R_V = usunięcie badanej substancji chemicznej poprzez ulatnianie się w badaniu biologicznym (%),

S_V = badana substancja chemiczna zgromadzona w pułapce w badaniu biologicznym, wyrażona jako ekwiwalent stężenia w płynnym wcieku (mg/l),

S_I = stężenie badanej substancji chemicznej we wcieku (mg/l).

c) W badaniu biologicznym udział procentowy (R_T) usunięcia badanej substancji chemicznej we wszystkich procesach jest wyliczany ze wzoru:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

gdzie:

S_E = stężenie badanej substancji chemicznej w (płynnym) odpływie (mg/l).

d) Stąd też udział procentowy (R_{BA}) usunięty poprzez biodegradację z adsorpcją można obliczyć ze wzoru:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Oddzielne badania należy przeprowadzić w celu określenia, czy badana substancja chemiczna podlega adsorpcji; jeśli tak, można dokonać dalszej korekty.

e) Porównanie pomiędzy proporcjami badanej substancji chemicznej usuniętej w układach badania biologicznego (R_V) i niebiologicznego (R_{VP}) wskazuje ogólny wpływ oczyszczania biologicznego na emisję badanej substancji chemicznej do atmosfery.

Przykład: benzen

Czas retencji osadu = 4 dni

Ściek syntetyczny; czas retencji = 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**

Stąd:

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % a R_{BA} = 85 %.

Przyjęto, że benzen nie ulega adsorpcji na osadzie.

BIBLIOGRAFIA

(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) Jakość wody – Wytyczne dotyczące przygotowania i obróbki słabo rozpuszczalnych związków organicznych w celu oceny ich biodegradacji w środowisku wodnym.

(5) Rozdział C.4 niniejszego załącznika. Oznaczenie szybkiej biodegradowalności.

▼M4

Dodatek 6

Wpływ czasu retencji osadu (CRO) na podatność substancji chemicznych na oczyszczanie

WPROWADZENIE

1. Metodę opisaną w głównej części tekstu stworzono w celu potwierdzenia, czy badane substancje chemiczne (zazwyczaj takie, o których wiadomo, że są zasadniczo biodegradowalne, ale nie ulegają szybkiej biodegradacji) mogą ulec biodegradacji w granicach nakładanych przez oczyszczalnie ścieków. Wyniki podawane są w postaci procentowej wartości usunięcia i procentowej wartości biodegradacji. Warunki działania zestawów osadu czynnego i wybór wcieku pozwalają na występowanie dość szerokiego zakresu stężeń badanej substancji chemicznej w odpływie. Badania przeprowadzane są tylko dla jednego stężenia nominalnego osadu stałego lub w odniesieniu do jednego czasu retencji osadu (CRO), a opisane schematy degradacji osadu mogą spowodować, że wartość CRO będzie ulegać znacznym zmianom w trakcie badania, zarówno w odniesieniu do wartości z kolejnych dni, jak i różnych wartości z tego samego dnia.

2. W tym wariancie (1) (2) CRO jest kontrolowany w znacznie węższych ramach przez 24 h (tak jak dzieje się to na dużą skalę), co powoduje bardziej stałe stężenie w odpływach. Zalecane są ścieki domowe, ponieważ dają bardziej spójne i wyższe wartości procentowe usunięcia. Ponadto bada się wpływ szeregu wartości CRO i w bardziej szczegółowym badaniu można określić wpływ różnych temperatur na stężenie odpływu.

3. Nie ma zgody co do tego, jakie modele kinetyczne mają zastosowanie w sytuacji, kiedy substancje chemiczne ulegają biodegradacji w warunkach oczyszczania ścieków. Wybrano zastosowanie modelu Monoda wzrostu bakterii i użycia substratu (1) (2) do zgromadzonych danych, ponieważ metoda ta miała być stosowana tylko do substancji chemicznych produkowanych w dużych ilościach, co skutkuje stężeniami w ściekach powyżej 1 mg/l. Ważność modelu uproszczonego i poczynionych założeń stwierdzono wykorzystując szereg związków oksyetylenowanych o różnych stopniach biodegradowalności pierwotnej (2) (3).

Uwaga: Ten wariant metody jest zgodny z większością tekstu dotyczącego tej metody badawczej C.10-A, zaś poniżej podano wyłącznie te aspekty, które są odmienne.

ZASADA BADANIA

4. Zestawy osadu czynnego z naczyniami porowatymi, które mają za zadanie ułatwienie (niemal) ciągłego wytracania mieszanego płynu, pozwalają na bardzo dokładną kontrolę czasu retencji osadu (CRO lub θ_s), działają w trybie niepołączonym w odniesieniu do szerokiego zakresu czasów retencji osadu oraz, opcjonalnie, w różnych temperaturach. Czas retencji wynosi zazwyczaj od 2 do 10 dni, a temperatura od 5 do 20 °C. Ścieki, najlepiej ścieki domowe, oraz roztwór badanej substancji chemicznej dawkowane są osobno do zestawów w tempie umożliwiającym otrzymanie wymaganego czasu retencji (3 do 6 godzin) oraz wymaganego stężenia badanej substancji chemicznej we wcieku. Równocześnie, dla celów porównawczych, działają zestawy kontrolne, które nie otrzymują badanej substancji chemicznej.

5. Możliwe jest wykorzystanie innego typu przyrządów, jednak należy zachować szczególną ostrożność, by zapewnić odpowiednią kontrolę CRO. Przykładowo, przy wykorzystywaniu instalacji obejmujących odstojnik konieczne może okazać się uwzględnienie utraty części stałych z odpływu z instalacji. Ponadto należy podjąć specjalne środki ostrożności w celu uniknięcia błędów wynikających ze zmiany ilości osadu w odstojniku.

▼M4

6. Zestawy pracują w określonych układach warunków i po osiągnięciu równowagi przez około trzy tygodnie uzyskuje się średnie stężenia w stanie ustalonym badanej substancji chemicznej w odpływach i – opcjonalnie – DOC. Oprócz oceniania wartości procentowej usunięcia badanej substancji chemicznej i – opcjonalnie – DOC, przedstawia się w formie graficznej stosunek pomiędzy warunkami działania instalacji a stężeniem w odpływie. Na podstawie tego można obliczyć próbne stałe kinetyczne oraz przewidzieć warunki, w jakich badana substancja chemiczna może być oczyszczana.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

7. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 12 i 13.

POZIOMY PROGOWE

8. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 14 i 15.

BADANE SUBSTANCJE ODNIESIENIA

9. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 16.

ODTWARZALNOŚĆ WYNIKÓW BADAŃ

10. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 17 i 18.

OPIS METODY

Przyrząd

11. Odpowiednim zestawem jest zmodyfikowany układ naczyń porowatych (dodatek 6.1). Składa się z naczynia wewnętrznego (wkładki) z porowatego polipropylenu o grubości 3,2 mm i maksymalnej średnicy porów 90 μm, w którym złącze jest zgrzane doczołowo. (Powoduje to, że zestaw jest trwalszy niż ten opisany w pkt 21 niniejszego rozdziału, C.10 A). Wkładka umieszczona jest w nieprzepuszczalnym polietylenowym naczyniu zewnętrznym, które składa się z dwóch części: okrągłej podstawy, w której wywiercono otwory w celu zamocowania dwóch linii powietrznych i jednej linii usuwania osadu oraz górnego cylindra, który przykręcony jest do podstawy i którego wylot umieszczony jest w takim miejscu, by wskazywał znaną ilość (3 l) w naczyniu porowatym. Jedna z linii powietrznych wyposażona jest w kamień napowietrzający, a druga ma otwarte zakończenie i jest usytuowana pod kątem prostym do kamienia w naczyniu. Układ ten powoduje powstanie wystarczających turbulencji, by zapewnić, że zawartość naczynia jest całkowicie wymieszana oraz utrzymać stężenie rozpuszczonego tlenu na poziomie większym niż 2 mg/l.

12. Odpowiednią liczbę zestawów utrzymuje się w kontrolowanych temperaturach w zakresie od 5 do 20 °C (± 1 °C), w kąpieli wodnej lub w pomieszczeniach o stałej temperaturze. Do dawkowania do naczyń napowietrzających roztworu badanej substancji chemicznej oraz osadzonych ścieków w wymaganym tempie (odpowiednio 0–1,0 ml/min i 0–25 ml/min) potrzebne są pompy; trzecia pompa konieczna jest do usuwania osadu odpadowego z naczyń napowietrzających. Niezbędne bardzo wolne tempo przepływu osadu odpadowego osiąga się dzięki zastosowaniu pompy ustawionej na wyższą wartość i uruchamianej z przerwami wyłącznikiem czasowym, np. działającej przez 10 sekund na minutę; szybkość podawania 3 ml/min daje tempo degradacji 0,5 ml/min.

Przyrząd do filtrowania lub wirówka

13. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 23.

Sprzęt do wykonywania analiz

14. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 24.

Woda

▼M4

15. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 25 i 26.

Pożywka organiczna

16. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 27.

Ścieki syntetyczne

17. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 28.

Ścieki domowe

18. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 29.

Osad czynny

19. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 30.

Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej

20. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 31 i 32.

PROCEDURA

Przygotowanie inokulum

21. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 34 – należy zastosować osad czynny (ok. 2,5 g/l).

Liczba zestawów badawczych

22. Do przeprowadzenia prostego testu, tzn. zmierzenia wartości procentowej usunięcia, potrzebna jest tylko jedna wartość CRO, ale do tego, by uzyskać dane potrzebne do wyliczenia próbnych stałych kinetycznych, konieczne jest 4 lub 5 wartości CRO. Wybiera się zazwyczaj wartości pomiędzy 2 a 10 dni. Z praktycznego punktu widzenia wygodne jest przeprowadzenie badania na 4 lub 5 CRO jednocześnie w jednej temperaturze; w rozszerzonych badaniach te same wartości CRO, lub inny zakres wartości, wykorzystuje się w innych temperaturach w zakresie od 5 do 20 °C. W przypadku pierwotnej biodegradacji (główne zastosowanie) konieczny jest zazwyczaj tylko jeden zestaw badawczy na jeden układ warunków. Jednakże do zbadania ostatecznej biodegradowalności potrzebny jest zestaw kontrolny do każdego układu warunków; do zestawu tego dodaje się ścieki, ale bez badanej substancji chemicznej. Jeśli zakłada się obecność badanej substancji chemicznej w używanych ściekach, konieczne jest zastosowanie zestawów kontrolnych przy ocenie pierwotnej biodegradacji i dokonanie właściwych korekt w obliczeniach.

Dawkowanie pożywki organicznej i badanej substancji chemicznej

23. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 36–39, jednak należy zauważyć, że roztwór badanej substancji chemicznej jest dawkowany osobno i że stosuje się różne współczynniki degradacji osadu. Należy również często, np. dwa razy dziennie, monitorować i w miarę potrzeby korygować – do ± 10 % – przepływ wcieku, odpływu i degradacji osadu. W przypadku wystąpienia trudności w stosowaniu metod analitycznych przy wykorzystywaniu ścieków domowych badanie należy przeprowadzić z wykorzystaniem ścieków syntetycznych, ale należy dopilnować, by różne media dawały porównywalne dane kinetyczne.

Postępowanie z zestawami osadu czynnego

24. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 40–43, ale CRO należy kontrolować tylko poprzez „stałą” degradację osadu.

Pobieranie próbek i analiza

25. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 44–50, z tą różnicą, że należy określić stężenie badanej substancji chemicznej, a określenie DOC jest opcjonalne; nie należy stosować ChZT.

▼M4

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

26. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 52–54.

Prezentacja wyników badania

27. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 56–62.

Obliczenie stałych kinetycznych

28. Podanie średniego stężenia plateau badanej substancji chemicznej w odpływie i opisanie, jak zmienia się ono wraz z warunkami działania instalacji, jest bardziej realistycznym rozwiązaniem niż podawanie procentowej biodegradacji pierwotnej. Można tego dokonać stosując równanie (6) z dodatku 6.2, które daje wartości K_S, μ_m oraz θ_{SC} – krytyczną wartość czasu retencji osadu.

(Alternatywnie można otrzymać przybliżone wartości K_S i μ_m, stosując prosty program komputerowy dostosowujący teoretyczną krzywą wyliczoną z równania 2 (dodatek 6.2) do otrzymanych wartości eksperymentalnych. Mimo że żadne rozwiązanie nie będzie unikalne, można uzyskać rozsądne przybliżenie wartości K_S i μ_m).

Zmienność wyników

29. Powszechnie zdarza się uzyskiwanie zmiennych wartości parametrów kinetycznych poszczególnych substancji chemicznych. Uważa się, że warunki, w jakich hodowany był osad, a także warunki występujące w trakcie badania (tak jak w pkt 5 i innych badaniach) mają duży wpływ na ostateczne wyniki. Jeden z aspektów tej zmienności omówili Grady i in. (4), którzy zasugerowali, że terminy „zastany" i „swoisty" powinny być stosowane do dwóch skrajnych warunków odpowiadających wartościom granicznym stanu fizjologicznego, który kultura może osiągnąć w trakcie eksperymentu kinetycznego. Jeśli stan ten nie może zmienić się w trakcie badania, wartości parametru kinetycznego odzwierciedlają warunki w środowisku, z którego pobrano mikroorganizmy; warunki te zwane są „zastanymi" lub obecnie istniejącymi. Z kolei w odwrotnej sytuacji, jeśli warunki badania zezwalają na pełny rozwój systemu syntetyzowania białka dopuszczając maksymalne możliwe tempo wzrostu, otrzymane parametry kinetyczne określa się jako „swoiste" i są one zależne tylko od charakteru substratu i typów bakterii w kulturze. Wartości zastane uzyskuje się poprzez utrzymanie stosunku stężenia substratu do właściwych mikroorganizmów (S_o/X_o) na poziomie niskim, np. 0,025, zaś wartości swoiste powstają, kiedy stosunek ten jest wysoki i wynosi np. co najmniej 20. W obydwu przypadkach S_o powinno być równe odpowiedniej wartości Ks – stałej półnasycenia – lub ją przekraczać.

30. Zmienność i inne aspekty kinetyki biodegradacji omawiano podczas ostatniego warsztatu SETAC (5). Dzięki takim badaniom, przeprowadzonym i planowanym, powinno być niedługo możliwe osiągnięcie jaśniejszego obrazu kinetyki w oczyszczalniach ścieków, co umożliwi lepszą interpretację istniejących badań oraz zasugeruje lepsze rozwiązania w przyszłych metodach badawczych.

BIBLIOGRAFIA:

(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**

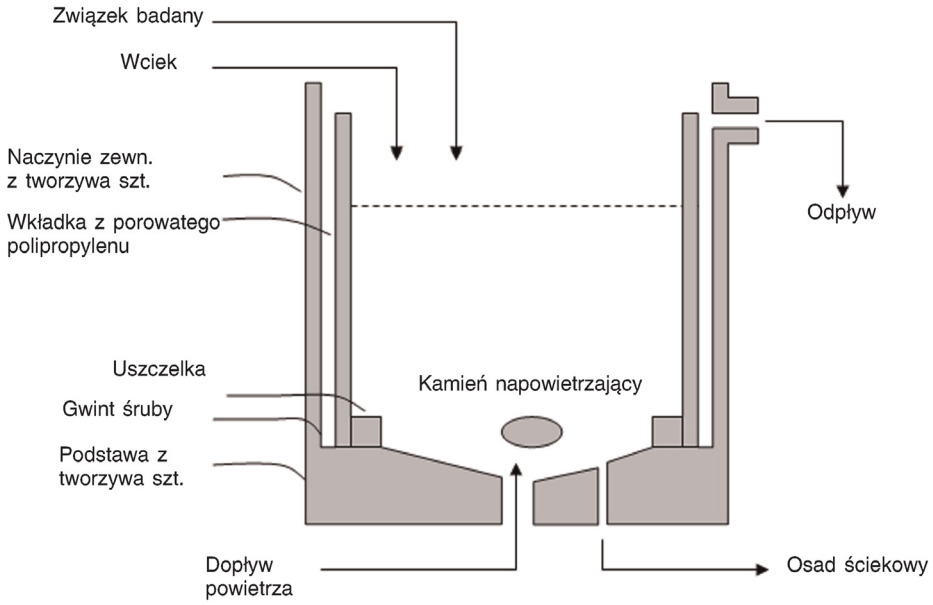
(4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res. 30 (3): 742–748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Warsztat w Port Sunlight, UK. [red.] Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4–6.9.1996. SETAC-Europa, Bruksela.

▼**M4**

Dodatek 6.1

Naczynie porowate z kontrolą CRO



▼M4

Dodatek 6.2

Obliczanie stałych kinetycznych

1. Zakładając zastosowanie kinetyki Monoda i bilansu masy aktywnych części stałych i substratów w całym układzie z osadem czynnym (1), otrzymać można następujące stany ustalone:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

albo

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

gdzie:

S_1 = stężenie substratu w odpływie (mg/l),

K_S = stała półnasycenia, przy którym stężenie $\mu = \mu_m/2$ (mg/l),

μ = właściwa szybkość wzrostu (d^{-1}),

μ_m = maksymalna wartość μ_m (d^{-1}),

K_d = właściwa szybkość rozpadu czynnych części stałych (d^{-1}),

θ_S = średni czas retencji osadu, CRO (d).

Zbadanie tego równania prowadzi do następujących wniosków:

(i) Stężenie w odpływie jest niezależne od stężenia we wcieku (S_0); dlatego też wartość procentowa biodegradacji zmienia się wraz ze zmianą stężenia we wcieku, S_0.

(ii) Jedynym parametrem kontroli instalacji mającym wpływ na S_1 jest czas retencji osadu, θ_S.

(iii) Przy danym stężeniu we wcieku, S_0, wystąpi krytyczny czas retencji osadu, taki że:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

gdzie:

θ_{SC} = krytyczny czas retencji osadu, poniżej którego właściwe mikroorganizmy będą wypłukiwane z instalacji.

(iv) Ponieważ inne parametry równania (2) są powiązane z kinetyką wzrostu, temperatura może mieć wpływ na poziom substratu w odpływie i krytyczny wiek osadu, tzn. czas retencji osadu potrzebny do otrzymania określonego poziomu oczyszczania wzrośnie wraz ze spadkiem temperatury.

2. Przy bilansie masy części stałych w układzie naczyń porowatych i zakładając, że stężenie części stałych w odpływie z instalacji, X_2, jest niskie w porównaniu ze stężeniem w naczyniu napowietrzającym, X_1, czas retencji osadu wynosi:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

oraz

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

gdzie:

V = objętość naczynia napowietrzającego (l),

X_1 = stężenie części stałych w naczyniu napowietrzającym (mg/l),

X_2 = stężenie części stałych w odpływie, (mg/l),

Q_0 = natężenie przepływu wcieku (l/d),

Q_1 = natężenie przepływu osadu odpadowego (l/d).

Dlatego też możliwe jest kontrolowanie czasu retencji osadu przy dowolnej wstępnie wybranej wartości poprzez kontrolę natężenia przepływu osadu odpadowego, Q_1.

Wnioski

3. Głównym celem badania jest przewidywanie stężenia odpływu, a dzięki temu poziomu badanej substancji chemicznej w odbiornikach wodnych.

4. Dzięki wykreśleniu S_1 względem θ_S możliwe jest czasem szybkie oszacowanie krytycznego czasu retencji osadu θ_{SC}, np. krzywa 3 na rysunku 1. Jeśli nie jest to możliwe, można obliczyć θ_{SC}, wraz z przybliżonym wartościami μ_m i K_S, dzięki wykreśleniu S_1 względem $S_1 \cdot \theta_S$.

Przekształcenie równania (1) daje

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Jeśli K_d jest małe, wówczas $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$ i [5] staje się:

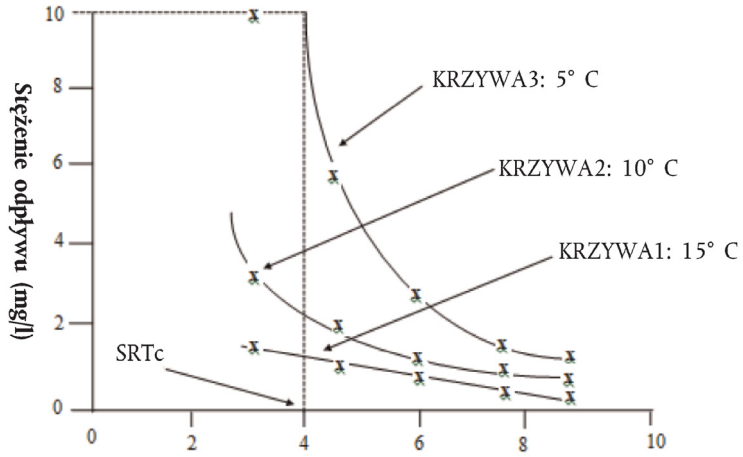
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Stąd też wykres powinien być linią prostą (zob. rysunek 2) o nachyleniu $1/\mu_m$ i punkcie przecięcia K_S/μ_m; tak więc $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

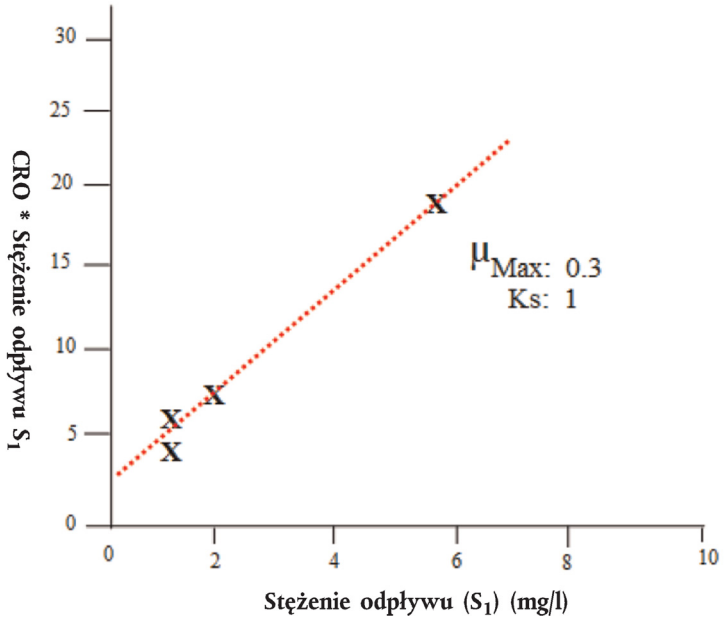
Rysunek 1

Trzy temperatury; pięć CRO



Rysunek 2

Linia regresji CRO · S_1 vs S_1 przy T = 5 °C



Glosariusz:

Stężenie odpływu

Krzywa

▼M4

Dodatek 7

BADANIE PRZY NISKIM (μg/l) ZAKRESIE STĘŻEŃ

1. Wiele substancji chemicznych obecnych jest normalnie w środowisku wodnym, nawet w ściekach, w bardzo niskich stężeniach (rzędu μg/l). Przy takich stężeniach raczej nie odgrywają one roli podstawowych substratów wzrostowych – bardziej prawdopodobne jest, że ulegną degradacji jako substraty niewzrostowe, drugorzędne, równoległe wobec różnorodnych naturalnie występujących substancji chemicznych zawierających węgiel. Dlatego też degradacja takich substancji chemicznych nie będzie odpowiadała modelowi opisanemu w dodatku 6. Istnieje wiele modeli, które można zastosować, a w warunkach występujących powszechnie w oczyszczalniach ścieków jednocześnie może działać ich kilka. Do wyjaśnienia tego zagadnienia potrzeba znacznie więcej badań.

2. Tymczasem można stosować procedurę podaną w głównym tekście (rozdział C.10 A), ale tylko do biodegradowalności pierwotnej, wykorzystując odpowiednio niskie stężenia (< 100 μg/l) oraz zwalidowaną procedurę analityczną. Wartość procentową biodegradacji można obliczyć (zob. pkt 54 metody badawczej) pod warunkiem że uwzględni się procesy abiotyczne (adsorpcję, lotność itp.). Przykładem jest tu badanie przeprowadzone przez Nyholma i jego współpracowników (1) (2), w którym wykorzystano 4-godzinny cykl w systemie sekwencyjnego reaktora biologicznego. Poinformowali oni o uzyskaniu stałych szybkości reakcji pseudopierwszego rzędu w odniesieniu do 5 substancji chemicznych dodanych do ścieków syntetycznych w stężeniu między 5 a 100 μg/l. (W odniesieniu do biodegradowalności ostatecznej można zastosować badane substancje chemiczne znakowane izotopem ^{14}C. Opis tego procesu wychodzi poza zakres niniejszej metody badawczej, ponieważ nie istnieją jeszcze żadne ustalone procedury, choć metoda zaproponowana dla ISO 14592 (3) zawiera wskazówki co do stosowania substancji chemicznych znakowanych izotopem ^{14}C.

Badanie SCAS

3. Później zaproponowano prostsze badanie dwuetapowe (4) (5) (6); po realizacji metody półciągłego osadu czynnego (SCAS) następują krótkie badania kinetyczne próbek pobranych z zestawów SCAS. Układ SCAS działa przy znanych współczynnikach ubytku osadu (w przeciwieństwie do pierwotnej metody badawczej C.12) i wykorzystuje zmodyfikowane ścieki syntetyczne OECD lub ścieki domowe. Ścieki syntetyczne zostały zmodyfikowane (z powodu zmiennej wartości pH oraz słabej sedymentacji osadu) poprzez dodanie fosforanu jako bufora, wyciągu z drożdży, chlorku żelaza(III) i soli pierwiastków śladowych, a ich ChZT zwiększono do ok. 750 mg/l dzięki podniesieniu stężenia peptonu i ekstraktu mięsa. Zestawy działały w cyklu 24-godzinnym: napowietrzanie przez 23 h, ubytek osadu, sedymentacja, usuwanie supernatantu (odpływu) i dodanie ścieków syntetycznych z badaną substancją chemiczną, do 100 μg/l (tzn. mniej więcej w tym samym stężeniu co stosowane w badaniu krótkoterminowym). Raz w tygodniu 10 % całości osadu wymieniano na świeży osad w celu utrzymania równowagi populacji bakterii.

4. Dokonuje się pomiarów stężeń badanej substancji chemicznej na początku i końcu napowietrzania, a badanie prowadzi się do momentu, kiedy osiągnięte zostanie stały poziom usuwania badanej substancji chemicznej; zajmuje to od jednego tygodnia do kilku miesięcy.

Badanie krótkoterminowe

5. Badanie krótkoterminowe (trwające ok. 8 godzin) stosuje się w celu określenia stałej szybkości reakcji (pseudo)pierwszego rzędu w odniesieniu do rozpadu badanej substancji chemicznej w osadzie czynnym o znanym, ale różnym pochodzeniu i historii. Próbki osadu pobierane są w szczególności z reaktorów SCAS – na koniec okresu napowietrzania, kiedy stężenie substratu organicznego jest niskie – w trakcie trwania eksperymentu aklimatyzacji (pkt 3, 4). Dla porównania osad może być również pobierany z równoległego zestawu SCAS bez badanej substancji chemicznej. Mieszaniny osadu i badanej substancji chemicznej dodawane w co najmniej dwóch

▼M4

stężeniach w zakresie 1–50 μg/l są napowietrzane, bez dodatku ścieków syntetycznych czy innych substratów organicznych. Badana substancja chemiczna pozostająca w roztworze jest oznaczana w regularnych, np. godzinnych, odstępach w oparciu o degradowalność substancji chemicznej, przez okres nie dłuższy niż 24 h. Przed właściwą analizą próbki są odwirowywane.

Obliczenia

6. Dane z zestawów SCAS są wykorzystywane do obliczenia wartości procentowej usunięcia (pkt 54). Tak więc średnią stałą szybkości reakcji, K_1 (normalizowaną w odniesieniu do stężeń zawiesin) można obliczyć z:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

gdzie:

t = czas napowietrzania (23 h),

C_e = stężenie pod koniec etapu napowietrzania (μg/l),

C_i = stężenie na początku etapu napowietrzania (μg/l),

SS = stężenie fazy stałej osadu czynnego (g/l).

7. W badaniu krótkoterminowym log % pozostałego stężenia jest wykreślany względem czasu, a nachylenie wstępnej części (10–50 % degradacji) wykresu jest równoważne K_1, stałej szybkości reakcji (pseudo)pierwszego rzędu. Stała jest normalizowana w odniesieniu do stężenia fazy stałej osadu poprzez podzielenie nachylenia przez stężenie fazy stałej. Podawany wynik musi również obejmować szczegółowe informacje na temat wstępnego stężenia badanej substancji chemicznej i zawiesin, czasu retencji osadu, podawania i źródła osadu, a także szczegółowe informacje o wstępnym narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej (o ile takie narażenie miało miejsce).

Zmienność wyników

8. Zmienność i inne aspekty kinetyki biodegradacji omawiano podczas ostatniego warsztatu SETAC (7). Dzięki takim badaniom, przeprowadzonym i planowanym, niedługo możliwe będzie lepsze zrozumienie kinetyki w oczyszczalniach ścieków, co umożliwi lepszą interpretację istniejących badań oraz zasugeruje lepsze rozwiązania w przyszłych metodach badawczych.

BIBLIOGRAFIA

(1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A i 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, i 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 i 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 i 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) Agencja Ochrony Środowiska Danii. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Ministerstwo Środowiska i Energii, Kopenhaga.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Warsztat w Port Sunlight, UK. [red.] Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, i Verstraete W. 4–6.9.1996. SETAC-Europa, Bruksela.

▼M4

C.10-B: Biofilmy

WPROWADZENIE

1. Badania symulacyjne zwykle stosuje się w przypadku chemikaliów, które nie przeszły badania przesiewowego szybkiej biodegradowalności (rozdział C.4 A do F niniejszego załącznika (9)), przeszły natomiast z powodzeniem badanie potencjalnej biodegradowalności. W drodze wyjątku badania symulacyjne stosuje się także do każdej substancji chemicznej, o której trzeba uzyskać więcej informacji, zwłaszcza chemikaliów o dużej wielkości obrotu. Wówczas zwykle stosuje się badanie osadu czynnego (C.10 A). W niektórych okolicznościach niezbędne są jednak konkretne informacje dotyczące zachowania substancji chemicznej w odpowiedzi na zastosowanie metod oczyszczania ścieków wykorzystujących biofilmy czyli złóż zraszanych, obrotowych filtrów biologicznych, złóż fluidalnych. Aby spełnić to zapotrzebowanie, opracowano różne urządzenia.

2. Gerike *et al*. (1) w ramach projektów pilotażowych zastosowali na dużą skalę złoża zraszane, stosowane w trybie zespolonym. Złoża te zajmowały dużo miejsca i wymagały stosunkowo dużych objętości ścieków lub ścieków syntetycznych. Truesdale *et al*. (2) opisali mniejsze złoża (ok. 1,8 m × 15 cm średnicy), które zasilano ściekami naturalnymi wolnymi od środków powierzchniowo czynnych, wymagające wciąż raczej dużych objętości ścieków. Aż 14 tygodni zajął rozwój „dojrzałego” biofilmu, a po pierwszym wprowadzeniu poddanego badaniu środka powierzchniowo czynnego potrzeba było kolejnych 4-8 tygodni, by nastąpiło przystosowanie.

3. Baumann *et al.* (3) zaprojektowali znacznie mniejsze złoże, w którym wykorzystali „wełnę” poliestrową zanurzoną uprzednio w osadzie czynnym jako chemicznie obojętną pożywkę wspomagającą biofilm. Substancja badana została zastosowana jako wyłączne źródło węgla, a biodegradowalność oceniano na podstawie pomiarów rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) we wcieku i odpływie oraz ilości CO_2 w gazie uchodzącym.

4. Gloyna *et al.* (4) zastosowali całkowicie inną metodę w wynalezionym przez nich obrotowym reaktorze rurowym. Na wewnętrznej powierzchni obracającej się rury, nachylonej pod niewielkim kątem w stosunku do poziomu, na znanej części powierzchni wywołano przyrost biofilmu poprzez przepływ wcieku wprowadzanego do rury od strony uniesionego końca. Reaktor stosowano do badania biodegradowalności środków powierzchniowo czynnych (5), a także do badania optymalnej grubości biofilmu i rozproszenia przez biofilm (6). Wyżej wymienieni autorzy udoskonalili projekt reaktora, wprowadzając do niego zmianę, dzięki której można ustalić zawartość CO_2 w gazie uchodzącym.

5. Obrotowy reaktor rurowy został przyjęty przez Stały Komitet Analityków (w Zjednoczonym Królestwie) jako standardowa metoda oceny zarówno biodegradowalności chemikaliów (7), jak i możliwości oczyszczenia ścieków oraz ich toksyczności (8). Opisana tu metoda ma liczne zalety, w tym: prostotę, niewielki rozmiar, odtwarzalność oraz zapotrzebowanie na stosunkowo niewielkie ilości pożywki organicznej.

ZASADA BADANIA

6. Na wewnętrzną powierzchnię wolno obracającej się nachylonej rury podaje się ścieki domowe lub syntetyczne oraz badaną substancję chemiczną, zawartą w mieszaninie lub osobno. Na wewnętrznej powierzchni rury tworzy się warstewka drobnoustrojów podobnych do tych występujących w biofiltrach. Warunki działania reaktora dobiera się pod kątem odpowiedniej eliminacji materii organicznej oraz, w miarę potrzeby, utleniania amoniaku.

▼M4

7. Odpływ z rury jest zbierany i osadzany albo filtrowany przed analizą pod kątem rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) lub badanej substancji chemicznej określoną metodą. Zestawy kontrolne nieotrzymujące badanej substancji chemicznej działają równolegle w tych samych warunkach dla celów porównania. Przyjmuje się, że różnica pomiędzy stężeniami DOC w odpływach z zestawów badawczych i zestawów kontrolnych wynika z działania badanej substancji chemicznej lub jej organicznych metabolitów. Różnicę tę porównuje się ze stężeniem we wcieku wprowadzonej badanej substancji chemicznej (na podstawie DOC) w celu obliczenia poziomu eliminacji badanej substancji chemicznej.

8. Biodegradację można przeważnie odróżnić od bioadsorpcji przez staranne badanie krzywej czasu eliminacji. Potwierdzenie uzyskać można zazwyczaj poprzez zastosowanie badania szybkiej biodegradacji (pobór tlenu lub wytwarzanie dwutlenku węgla) z użyciem aklimatyzowanego inokulum pobranego na końcu badania z reaktorów otrzymujących badaną substancję chemiczną.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

9. Właściwości badanej substancji chemicznej związane z czystością, rozpuszczalnością w wodzie, lotnością i adsorpcją powinny być znane, tak aby możliwa była prawidłowa interpretacja wyników.

10. Zwykle nie jest możliwe badanie lotnych ani słaboro zpuszczalnych chemikaliów, chyba że podjęte zostaną szczególne środki ostrożności (zob. dodatek 5 do rozdziału C.10 A). Należy również znać strukturę chemiczną, a przynajmniej wzór empiryczny, tak aby można było obliczyć wartości teoretyczne lub sprawdzić zmierzone wartości parametrów, np. teoretyczne zapotrzebowanie na tlen (TZT) czy zawartość rozpuszczonego węgla organicznego (DOC).

11. Informacje na temat toksyczności badanej substancji chemicznej dla mikroorganizmów (zob. dodatek 4 do rozdziału C.10 A) mogą być bardzo użyteczne przy wyborze odpowiednich stężeń do badania i mogą być niezbędne dla prawidłowej interpretacji niskich wartości biodegradacji.

POZIOMY PROGOWE

12. Początkowo wymagano, by biodegradacja pierwotna środków powierzchniowo czynnych dochodziła do 80 % lub więcej, nim substancja chemiczna mogła zostać wprowadzona do obrotu. Jeśli poziom 80 % nie zostanie osiągnięty, można zastosować badanie symulacyjne (potwierdzające), a środek powierzchniowo czynny można wprowadzić na rynek wyłącznie, jeśli ponad 90 % danej substancji chemicznej zostanie usunięte. Ogólnie w przypadku substancji chemicznych nie mówi się o przejściu z powodzeniem/bez powodzenia badania, a uzyskana wartość procentowa usunięcia może zostać wykorzystana w aproksymacji prawdopodobnego stężenia w środowisku stosowanej przy ocenach zagrożenia stwarzanego przez substancje chemiczne. W wielu badaniach czystych substancji chemicznych w przypadku ponad trzech czwartych substancji stwierdzono wartość procentową usunięcia DOC na poziomie > 90 %, a dla ponad 90 % substancji chemicznych, które wykazywały jakikolwiek znaczący poziom biodegradowalności, wartość ta wynosiła > 80 %.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

13. Dla prawidłowego przeprowadzenia procedury doświadczalnej warto od czasu do czasu, wraz z substancjami badanymi, testować substancje odniesienia, których zachowanie jest znane. Substancje takie to na przykład kwas adypinowy, 2-fenylofenol, 1-naftol, kwas 2,2'-bifenylodikarboksylowy, kwas 1-naftalenokarboksylowy.

ODTWARZALNOŚĆ WYNIKÓW BADAŃ

14. W laboratorium w Wielkiej Brytanii stwierdzono, że względne odchylenie standardowe w badaniach wynosiło 3,5 %, a między badaniami 5 % (7).

▼M4

OPIS METODY

Przyrząd

Obrotowe reaktory rurowe

15. Przyrząd (zob. rysunki 1 i 2 w dodatku 8) składa się z baterii rur akrylowych o długości 30,5 cm każda i o średnicy wewnętrznej 5 cm, opartych na kołach o gumowanych brzegach, umieszczonych w metalowej oprawie. Każda rura posiada kołnierz zewnętrzny o szerokości ok. 0,5 cm do podtrzymania jej na kołach, jej powierzchnia wewnętrzna jest zarysowana przy użyciu druciaka, od strony uniesionego końca (służącego do podawania materiału doprowadzanego) rura wyposażona jest w głęboki na 0,5 cm kołnierz wewnętrzny, służący do przytrzymania cieczy. Rury nachylone są pod kątem około jednego stopnia w stosunku do poziomu, aby uzyskać czas potrzebny na kontakt ze stosowaną w badaniu pożywką, wprowadzaną do czystej rury. Gumowane koła obracają się napędzane silnikiem o powolnych obrotach zmiennej prędkości. Temperatura rur kontrolowana jest przez ich instalację w pomieszczeniu o stałej temperaturze.

16. Dzięki zamknięciu każdego reaktora rurowego w nieco większej zamkniętej rurze i uszczelnienie połączeń przeciw wyciekom gazu, uchodzący gaz CO_2 można było zebrać w roztworze alkalicznym w celu jego dalszego pomiaru (6).

17. Dobowy zapas pożywki organicznej, w stosownych przypadkach z dodatkiem badanej substancji chemicznej, przeznaczonej do podawania do każdej rury, umieszczono w 20-litrowym zbiorniku magazynującym (A) (zob. rysunek 2). W miarę potrzeby roztwór badanej substancji chemicznej może być dawkowany osobno. Przy dnie każdego zbiornika magazynującego znajduje się ujście, które jest podłączone przez odpowiednie złączki, np. wykonane z gumy silikonowej, przez pompę perystaltyczną (B), do szklanej lub akrylowej rury doprowadzającej, która wprowadzona jest na głębokość 2–4 cm do uniesionego końca nachylonej rury (służącego do podawania materiału doprowadzanego) (C). Pozwala się, by odpływ skapywał ze znajdujacego się niżej końca nachylonej rury do innego zbiornika magazynującego (D). Odpływ jest osadzany lub filtrowany przed analizą.

Przyrząd do filtrowania lub wirówka

18. Urządzenie do filtrowania próbek z filtrami membranowymi o odpowiedniej porowatności (nominalna średnica otworu 0,45 μm), które adsorbują organiczne substancje chemiczne i uwalniają węgiel organiczny w minimalnym stopniu. W przypadku stosowania filtrów uwalniających węgiel organiczny należy zmyć filtry dokładnie gorącą wodą w celu usunięcia wymywalnego węgla organicznego. Alternatywnie można zastosować wirówkę mogącą osiągnąć 40 000 m/s^2.

19. Sprzęt do wykonywania analiz służący do oznaczenia:

— zawartości rozpuszczonego węgla organicznego (DOC), całkowitego węgla organicznego (TOC) lub chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT),

— konkretnej substancji chemicznej (metodą HPLC, GC itp.), o ile jest to konieczne,

— pH, temperatury, kwasowości, zasadowości,

— amonu, azotynu i azotanu, jeśli badanie przeprowadzane jest w warunkach nitryfikacyjnych.

Woda

20. Woda wodociągowa, zawierająca mniej niż 3 mg/l DOC.

21. Woda destylowana lub dejonizowana, zawierająca mniej niż 2 mg/l DOC.

▼M4

Pożywka organiczna

22. Jako pożywkę organiczną można stosować ścieki syntetyczne, ścieki domowe lub mieszaninę obydwu ich rodzajów. Wykazano, że zastosowanie wyłącznie ścieków domowych często skutkuje zwiększonym odsetkiem usuniętego DOC (w zestawach osadu czynnego), a nawet umożliwia biodegradację niektórych substancji chemicznych, które nie ulegają biodegradacji w przypadku zastosowania syntetycznych ścieków OECD. Dlatego też zaleca się stosowanie ścieków domowych. Należy zmierzyć stężenie DOC lub ChZT w każdej nowej partii pożywki organicznej. Kwasowość lub zasadowość pożywki organicznej powinna być znana. Pożywka może wymagać dodania odpowiedniego bufora (wodorowęglanu sodu lub wodorofosforanu potasu), jeżeli jej poziom kwasowości lub zasadowości jest niski, w celu utrzymania pH w reaktorze w trakcie badania na poziomie ok. 7,5 ± 0,5. Ilość dodawanego bufora oraz moment jego dodania należy określić indywidualnie dla każdego przypadku.

Ścieki syntetyczne

23. Rozpuścić w każdym litrze wody wodociągowej: pepton, 160 mg; ekstrakt mięsa, 110 mg; mocznik, 30 mg; fosforan dwupotasowy bezwodny (K_2HPO_4), 28 mg; chlorek sodu (NaCl), 7 mg; chlorek wapnia dwuwodny ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; siarczan magnezu siedmiowodny ($Mg_2SO_4.7H_2O$), 2 mg. Ten ściek syntetyczny OECD stanowi przykład i daje średnie stężenie DOC we wcieku na poziomie ok. 100 mg/l. Alternatywnie można wykorzystać inne składy o zbliżonym stężeniu DOC, które bardziej odpowiadają prawdziwym ściekom. Taki ściek syntetyczny można przygotować w wodzie destylowanej w postaci skoncentrowanej i przechowywać w temperaturze ok. 1 °C przez maksymalnie jeden tydzień. W razie potrzeby należy go rozcieńczyć wodą wodociągową. (Ta pożywka nie jest satysfakcjonująca, np. stężenie azotu jest bardzo wysokie, a zawartość węgla dość niska, ale nie zaproponowano niczego lepszego poza ewentualnym dodaniem większej ilości fosforanu jako bufora i dodatkowego peptonu).

Ścieki domowe

24. Wykorzystać świeżo osadzone ścieki zbierane codziennie z oczyszczalni ścieków przyjmującej głównie ścieki domowe. Ścieki powinny być zbierane przed wstępną sedymentacją z przelewu wstępnego osadnika lub z materiału doprowadzanego do instalacji osadu czynnego i zasadniczo nie powinny zawierać cząsteczek gruboziarnistych. Ścieki można stosować po przechowywaniu ich przez kilka dni w temperaturze ok. 4 °C, po sprawdzeniu, czy poziom DOC (lub ChZT) nie zmniejszył się znacząco (tzn. o mniej niż 20 %) w trakcie przechowywania. Aby zmniejszyć zakłócenia w układzie, przed zastosowaniem należy skorygować DOC (lub ChZT) każdej nowej partii do odpowiedniej stałej wartości, np. poprzez rozcieńczenie wodą wodociągową.

Środek smarny

25. Do smarowania rolek pompy perystaltycznej można stosować glicerynę lub oliwę z oliwek. Obie substancje nadają się do użycia na rurkach z gumy silikonowej.

Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej

26. W przypadku substancji chemicznych o odpowiedniej rozpuszczalności przygotować roztwory podstawowe o właściwych stężeniach (np. 1 do 5 g/l) w wodzie dejonizowanej lub w części mineralnej ścieków syntetycznych. W przypadku nierozpuszczalnych substancji chemicznych, zob. dodatek 5 rozdziału C.10-A. Bez wprowadzenia modyfikacji do reaktorów rurowych (zob. pkt 16) metoda ta nie nadaje się do lotnych substancji chemicznych. Oznaczyć DOC i całkowity węgiel organiczny (TOC) roztworu podstawowego i powtórzyć pomiary przy każdej nowej partii. Jeśli różnica pomiędzy DOC a TOC jest większa niż 20 %, sprawdzić rozpuszczalność badanej

▼M4

substancji chemicznej w wodzie. Porównać DOC lub stężenie badanej substancji chemicznej, mierzone z użyciem swoistej metody analitycznej w roztworze podstawowym z wartością nominalną w celu stwierdzenia, czy odzysk jest wystarczający (zwykle można spodziewać się wartości > 90 %). Sprawdzić, w szczególności w przypadku dyspersji, czy można wykorzystać DOC jako parametr analityczny, czy też możliwe jest wyłącznie zastosowanie techniki analitycznej swoistej dla badanej substancji chemicznej. W przypadku dyspersji konieczne jest odwirowanie próbek. W każdej nowej partii zmierzyć DOC, ChZT lub badaną substancję chemiczną przy użyciu swoistej metody analitycznej.

27. Określić pH roztworu podstawowego. Wartości krańcowe wskazują, że dodanie substancji chemicznej może mieć wpływ na pH osadu czynnego w układzie badawczym. W takim przypadku w celu uzyskania pH o wartości 7 ± 0,5 należy zneutralizować roztwór podstawowy, dodając niewielkie ilości kwasu nieorganicznego lub zasady, ale unikając strącania badanej substancji chemicznej.

PROCEDURA

Przygotowanie pożywki organicznej do dozowania

28. Na początku i w trakcie trwania badania dopilnować, by pojemniki na wciek i odpływ oraz rury prowadzące ze zbiorników na wciek i do zbiorników na odpływ były dokładnie oczyszczone, aby usunąć przyrost mikroorganizmów.

29. Codziennie przygotować świeże ścieki syntetyczne (pkt 23) z substancji stałych lub ze skoncentrowanego roztworu podstawowego przez odpowiednie rozcieńczanie wodą wodociągową. Mierzyć potrzebną ilość w cylindrze i dodawać do czystego zbiornika na wciek. Do ścieków syntetycznych przed rozcieńczeniem należy także, w miarę potrzeb, dodać konieczną ilość roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej lub substancji odniesienia. W przypadku gdy jest to wygodniejsze lub niezbędne dla uniknięcia strat badanej substancji chemicznej, przygotować oddzielny rozcieńczony roztwór badanej substancji chemicznej w osobnym zbiorniku i doprowadzać go do nachylonych rur za pośrednictwem innej pompy dozującej.

30. Alternatywnie, w miarę możliwości, należy stosować osadzone ścieki domowe (pkt 24) zbierane, o ile to możliwe, codziennie.

Praca obrotowych reaktorów rurowych

31. Do oceny jednej badanej substancji chemicznej potrzebne są dwa identyczne reaktory rurowe, instalowane w pomieszczeniu o stałej temperaturze zwykle 22 ± 2 °C.

32. Pompy perystaltyczne nastawić na podawanie do nachylonych rur, obracających się z prędkością 18 ± 2 obr./min, pożywki organicznej w ilości 250 ± 25 ml/h (bez badanej substancji chemicznej). Do rur pompy stosować na początku oraz regularnie w trakcie badania środek smarny (pkt 25), aby zapewnić właściwe działanie i przedłużyć okres użytkowania rur.

33. Dostosować kąt nachylenia rur w stosunku do poziomu tak, by uzyskać czas przebywania materiału doprowadzanego w czystej rurze rzędu 125 ± 12,5 sek. Oszacować czas retencji przez dodanie do materiału doprowadzanego markera niebiologicznego (np. NaCl, chemicznie obojętnego barwnika): przyjmuje się, że czas, jaki zajmuje osiągnięcie najwyższego stężenia w odpływie, to średnia arytmetyczna czasu retencji (gdy występuje najgrubsza warstwa biofilmu, czas retencji może zwiększyć się do ok. 30 min).

34. Stwierdzono, że te współczynniki, prędkości i czasy dają odpowiedni poziom usuwania (> 80 %) DOC (lub ChZT) i wytwarzają nitryfikowany odpływ. Jeśli poziom usuwania jest niewystarczający lub jeśli ma być symulowane działanie konkretnej oczyszczalni ścieków, należy zmienić współczynnik przepływu. W tym drugim przypadku, dostosować współczynnik dozowania pożywki organicznej do poziomu, przy jakim działanie reaktora odpowiada działaniu danej oczyszczalni ścieków.

▼M4

Inokulacja

35. Gdy stosowane są ścieki syntetyczne, do zapoczątkowania rozwoju mikroorganizmów może być wystarczająca inokulacja drogą powietrzną, w innym przypadku należy do materiału doprowadzanego przez 3 dni dodawać 1 ml/l osadzonych ścieków.

Pomiary

36. Należy w regularnych odstępach czasu sprawdzać, czy dawki i prędkość obrotowa mieszczą się w wymaganych granicach. Należy także mierzyć pH w odpływie, w szczególności gdy spodziewana jest nitryfikacja.

Pobieranie próbek i analiza

37. Metodę, schemat i częstotliwość pobierania próbek dobiera się tak, by były odpowiednie dla celu badania. Przykładowo należy pobrać jednorazową próbkę wcieku i odpływu lub pobierać próbki przez dłuższy okres np. 3–6 godzin. W pierwszym okresie, bez badanej substancji chemicznej, pobierać próbki dwa razy w tygodniu. Próbki należy przefiltrować przez membranę lub odwirować przy ok. 40 000 m/sek^2 przez około 15 min (pkt 18). Przed filtrowaniem przez membranę może być konieczne osadzenie lub przefiltrowanie próbek przez filtr dla cząstek grubych. Oznaczyć DOC (lub ChZT) co najmniej w duplikacie oraz w miarę konieczności biologiczne zapotrzebowanie na tlen (BZT), amon, azotyn i azotan.

38. Wszystkie analizy należy przeprowadzać jak najszybciej po zebraniu i przygotowaniu próbek. Jeśli analizy muszą zostać odroczone, próbki należy przechowywać w temperaturze ok. 4 °C w ciemności, w pełnych i szczelnie zamkniętych butelkach. Jeśli próbki muszą być przechowywane przez ponad 48 h, należy zabezpieczyć je przez głębokie mrożenie, zakwaszenie lub dodanie odpowiedniej substancji toksycznej (np. 20 ml/l roztworu chlorku rtęci(II) o stężeniu 10 g/l). Zadbać, by technika zabezpieczenia nie miała wpływu na wyniki analizy.

Okres rozruchu

39. W tym okresie biofilm na powierzchni przyrasta, by osiągnąć optymalną grubość, co zwykle zajmuje około 2 tygodnie i raczej nie przekracza 6 tygodni. Poziom usuniętego DOC (lub ChZT) rośnie (pkt 44) i osiąga wartość plateau. Gdy osiągnięte zostaje plateau o podobnej wartości w obu rurach, jedna wybierana jest jako próbka kontrolna na pozostały czas badania, w którym ich działanie powinno pozostawać zbliżone.

Wprowadzenie badanej substancji chemicznej

40. Na tym etapie dodać badaną substancję chemiczną do drugiego reaktora w pożądanym stężeniu, zwykle 10–20 mg C/l. W próbie kontrolnej podaje się nadal samą pożywkę organiczną.

Okres przystosowania

41. Kontynuować dokonywanie analiz DOC (lub ChZT) dwa razy w tygodniu, a jeśli ma być oceniona biodegradowalność pierwotna, mierzyć także stężenie badanej substancji chemicznej z użyciem swoistej metody analitycznej. Po wprowadzeniu po raz pierwszy badanej substancji chemicznej należy przewidzieć okres od jednego do sześciu tygodni (lub dłużej w szczególnych warunkach) na przystosowanie. W przypadku gdy procent usunięcia badanej substancji (pkt 43-45) osiąga maksymalną wartość, należy uzyskać 12–15 ważnych wartości z fazy plateau przez okres około 3 tygodni w celu oceny średniej procentowej wartości usunięcia. Badanie uznaje się za ukończone, jeśli osiągnięty zostaje odpowiednio wysoki poziom eliminacji. Nie należy zwykle przekraczać 12 tygodni trwania badania po dodaniu badanej substancji chemicznej.

▼M4

Usuwanie biofilmu

42. Względnie regularnie następuje nagłe usunięcie z rur, czy też złuszczanie się, nadmiaru filmu. W celu dopilnowania, by pozostało to bez wpływu na porównywalność wyników, należy przewidzieć co najmniej dwa pełne cykle przyrastania i złuszczania się.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

43. Obliczyć wartość procentową eliminacji DOC (lub ChZT) badanej substancji chemicznej w odniesieniu do każdej oceny w czasie, stosując równanie:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\%$$

gdzie:

D_t = procentowa eliminacja DOC (lub ChZT) w czasie t,

Cs = stężenie DOC (lub ChZT) we wcieku w wyniku działania badanej substacji chemicznej, najlepiej oszacowane ze stężenia oraz dodanej objętości roztworu podstawowego (mg/l),

E = mierzona wartość DOC (lub ChZT) w badanym odpływie w czasie t (mg/l),

Eo = mierzona wartość DOC (lub ChZT) w odpływie kontrolnym w czasie t (mg/l).

Obliczenia powtórzyć dla substancji odniesienia, jeśli jest badana.

Działanie reaktora kontrolnego

44. Stopień eliminacji (D_B) DOC (lub ChZT) pożywki organicznej w reaktorach kontrolnych stanowi przydatną informację przy ocenie biodegradującego działania biofilmu w trakcie badania. Obliczyć wartość procentową eliminacji z równania:

$$D_B = 100(1 - E_o/C_m)\%$$

gdzie:

Cm = DOC (lub ChZT) pożywki organicznej we wcieku kontrolnym (mg/l).

45. Obliczyć usunięcie (D_{ST}) badanej substancji chemicznej, jeśli je mierzono, przy użyciu właściwej metody analitycznej przy każdej ocenie w czasie, z równania:

$$DST = 100(1 - Se/Si)\%$$

gdzie:

Si = mierzone lub, w miarę możliwości, szacowane stężenie badanej substancji chemicznej we wcieku badanym (mg/l),

Se = mierzone stężenie badanej substancji chemicznej we wcieku kontrolnym w czasie t (mg/l).

▼M4

Jeśli metoda analityczna daje pozytywną wartość w nieskorygowanym równoważniku ścieków do S_c mg/l, obliczyć wartość procentową usunięcia (D_{SC}) z:

$$DSC = 100(Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\%$$

Prezentacja wyników badania

46. Przedstawić w postaci wykresu wartość procentową eliminacji D_t i D_{ST} (lub D_{SC}), jeśli jest dostępna, w stosunku do czasu (zob. dodatek 2 rozdziału C.10-A). Jako procentową wartość usunięcia badanej substancji chemicznej przyjąć średnią arytmetyczną (przedstawioną jako najbliższą liczbę całkowitą) i odchylenie standardowe 12-15 wartości dla D_T (oraz dla D_{ST}, jeśli jest dostępna) uzyskanych w fazie plateau. Z kształtu krzywej eliminacji można wysnuć wnioski dotyczące procesów usuwania.

Adsorpcja

47. Jeśli na początku badania obserwuje się wysoką eliminację DOC, badana substancja chemiczna jest prawdopodobnie eliminowana przez adsorpcję na biofilm. Możliwe jest udowodnienie tego poprzez oznaczenie adsorbowanej badanej substancji chemicznej w złuszczonych substancjach stałych biofilmu. Wysoki poziom eliminacji DOC adsorbowalnych substancji chemicznych podczas całego badania nie jest typowy; zazwyczaj na początku występuje wysoki poziom usuwania, który następnie spada do równomiernego poziomu. Jeśli jednak adsorbowana badana substancja chemiczna spowodowała przystosowanie populacji mikroorganizmów, eliminacja DOC badanej substancji chemicznej zwiększyłaby się w następstwie i osiągnęła wysoki poziom plateau.

Faza zastoju

48. Tak samo jak w przypadku statycznych badań przesiewowych, wiele badanych substancji chemicznych wymaga fazy zastoju przed wystąpieniem pełnej biodegradacji. W fazie zastoju następuje przystosowanie (lub adaptacja) bakterii odpowiadających za rozkład przy jednoczesnym prawie całkowitym braku usuwania badanej substancji chemicznej; następnie następuje wstępny przyrost tych bakterii. Zakłada się, że ta faza kończy się, a zaczyna faza degradacji, kiedy następuje usunięcie ok. 10 % wstępnej ilości badanej substancji chemicznej (po adsorpcji, o ile takowa wystąpi). Faza zastoju jest często bardzo zmienna i słabo odtwarzalna.

Faza plateau

49. Faza plateau na krzywej eliminacji w teście ciągłym definiowana jest jako ta faza, w której następuje największa degradacja. Faza plateau powinna trwać co najmniej 3 tygodnie i należy w jej trakcie dokonać około 12–15 ważnych pomiarów wartości.

Średni stopień eliminacji badanej substancji chemicznej

50. Obliczyć średnią wartość z wartości eliminacji D_t (oraz D_{st}, jeśli jest dostępna) badanej substancji chemicznej w fazie plateau. W zaokrągleniu do najbliższej liczby całkowitej (1 %) stanowi ona stopień eliminacji badanej substancji chemicznej. Zaleca się również obliczenie 95 % przedziału ufności średniej wartości. W podobny sposób obliczyć średni stopień eliminacji (D_B) pożywki organicznej w naczyniu kontrolnym.

▼M4

Wskazanie biodegradacji

51. Jeśli badana substancja chemiczna nie adsorbuje w znaczącym stopniu na biofilmie, a krzywa eliminacji ma typowy kształt krzywej biodegradacji z fazami zastoju, degradacji i plateau (ust. 48, 49), zmierzoną eliminację można bezpiecznie przypisać do biodegradacji. Jeśli zaszło znaczne wstępne usuwanie, badanie symulacyjne nie pozwala na dokonanie rozróżnienia między procesami eliminacji biologicznej i abiotycznej. W takich przypadkach oraz w innych przypadkach, gdy występuje wątpliwość dotycząca biodegradacji (np. ma miejsce odpadanie biofilmu) należy zanalizować badaną substancję chemiczną w próbkach filmu lub przeprowadzić dodatkowe statyczne badania (przesiewowe) biodegradowalności w oparciu o parametry jasno wskazujące na procesy biologiczne. Takie badania to testy poboru tlenu (rozdział C.4 niniejszego załącznika D, E i F) (9) lub badanie, które mierzy wytwarzanie CO_2 (rozdział C.4-C niniejszego załącznika dotyczący metody pomiaru dwutlenku węgla w przestrzeni nad roztworem) (10); jako inokulum należy zastosować biofilm z odpowiedniego reaktora, uprzednio poddany działaniu badanej substancji chemicznej.

52. Jeśli zmierzono zarówno wartość usuwania DOC, jak i usuwania konkretnej substancji chemicznej, znaczące różnice (ta pierwsza niższa od tej drugiej) między usuniętymi wartościami procentowymi wskazują na obecność w odpływie półproduktów produktów organicznych, które mogą być trudne do rozłożenia i należy je zbadać.

Ważność wyników badania

53. Badanie należy uznać za ważne, jeśli stopień eliminacji DOC (lub ChZT) (D_B) w zestawach kontrolnych wynosi > 80 % pod dwóch tygodniach działania i nie poczyniono obserwacji nietypowych.

54. Jeśli badano szybko biodegradowalną substancję chemiczną (odniesienia), stopień biodegradacji powinien wynosić > 90 %, a różnica między wartościami w duplikatach nie powinna wynosić więcej niż 5 %. Jeśli te dwa kryteria nie są spełnione, dokonać przeglądu procedur doświadczalnych i pozyskać ścieki domowe z innego źródła.

55. Podobnie różnice między wartościami biodegradacji z zestawów stanowiących duplikaty (jeśli są stosowane), poddawanych działaniu badanej substancji chemicznej, nie powinny wynosić więcej niż 5 %. Jeśli to kryterium nie jest spełnione, ale poziom usuwania jest wysoki, prowadzić analizę przez kolejne trzy tygodnie. Jeśli poziom usuwania jest niski, zbadać hamujący wpływ badanej substancji chemicznej, jeśli nie jest znany, i powtórzyć badanie przy niższym stężeniu badanej substancji chemicznej, jeśli to możliwe.

Sprawozdanie z badania

56. Sprawozdanie z badania musi zawierać co najmniej następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— dane identyfikacyjne,

— cechy fizyczne oraz w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne.

Warunki badania

— wszelkie zmiany układu badawczego, zwłaszcza jeśli badane są nierozpuszczalne lub lotne substancje chemiczne,

— rodzaj pożywki organicznej,

— proporcja i charakter odpadów przemysłowych w ściekach, jeśli są wykorzystywane i znane,

— metoda inokulacji,

▼M4

— zawartość DOC (rozpuszczonego węgla organicznego) i TOC (całkowitego węgla organicznego) w roztworze podstawowym badanej substancji chemicznej; sposób przygotowania, w przypadku zawiesiny; stosowane stężenia badanej substancji chemicznej, podać powody, jeśli wykraczają poza zakres 10-20 mg/l DOC; metoda podania; data pierwszego podania; wszelkie zmiany w stężeniu,

— średni hydrauliczny czas zatrzymania (przy braku przyrostu); prędkość obrotowa rury; w miarę możliwoście przybliżony kąt nachylenia,

— szczegółowe informacje dotyczące złuszczania się; czas i natężenie,

— temperatura badania i zakres,

— stosowane techniki analityczne.

Wyniki badania

— w stosownych przypadkach wszelkie dane z pomiarów DOC, ChZT, specyficzne analizy, pH, temperatura, substancje chemiczne N,

— dane z wyliczeń D_t (lub D_{tc}), D_B, D_s uzyskane w postaci tabeli i krzywe eliminacji,

— informacje o fazach zastoju i plateau, czas trwania badania, stopień eliminacji badanej substancji chemicznej, substancji odniesienia (jeśli jest badana) i pożywki organicznej (w zestawie kontrolnym) wraz z danymi statystycznymi i stwierdzeniami dotyczącymi biodegradowalności i ważności badania,

— omówienie wyników.

BIBLIOGRAFIA:

(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, Londyn.

(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, Londyn.

(9) Rozdział C.4 niniejszego załącznika: Oznaczanie szybkiej biodegradowalności A–F.

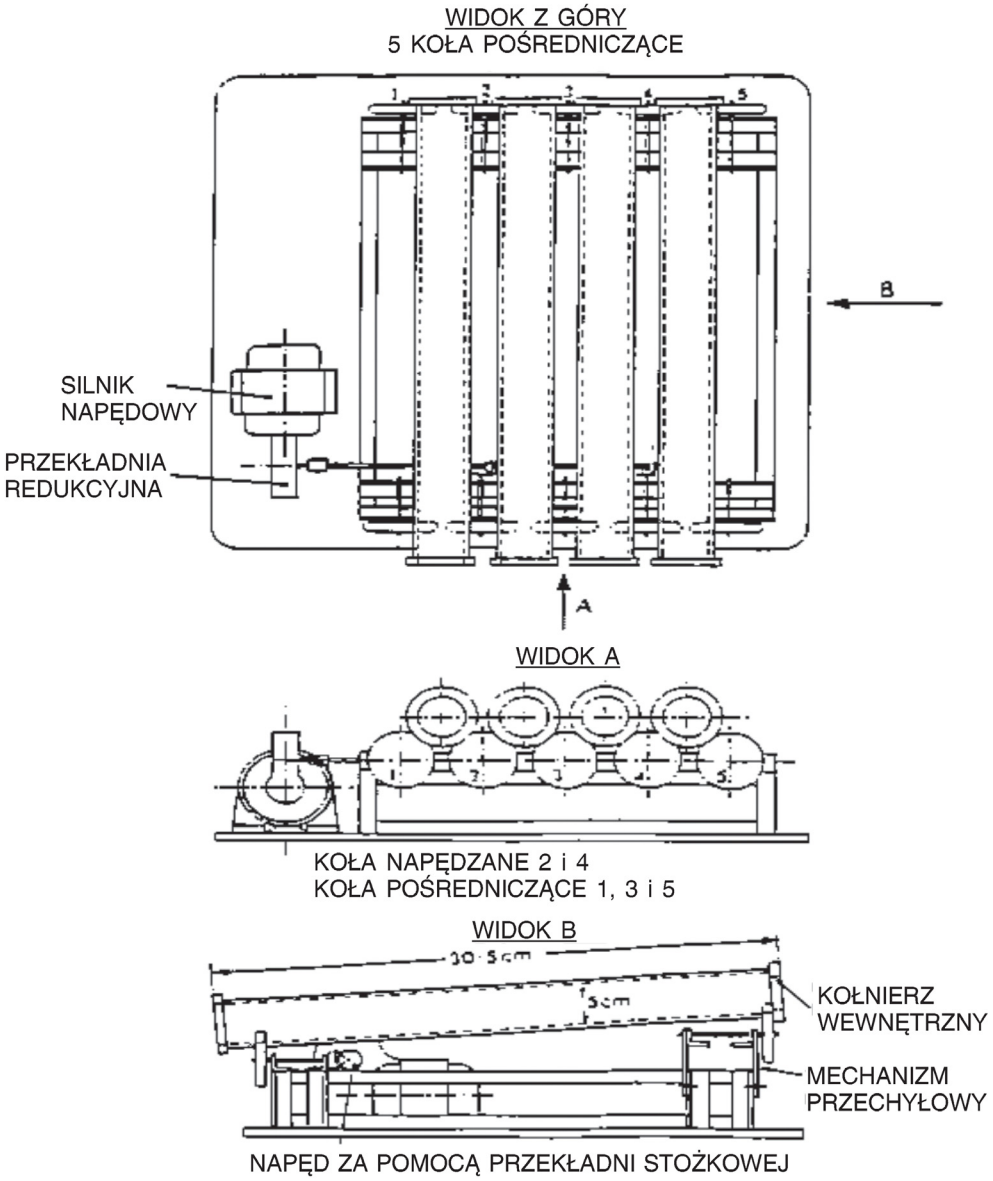
(10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

Dodatek 8

Rysunek 1

Rury obrotowe



Glosariusz:

Widok z góry:

Widok A/B

Koła napędzane

Koła pośredniczące

Silnik napędowy

Przekładnia redukcyjna

Kołnierz wewnętrzny

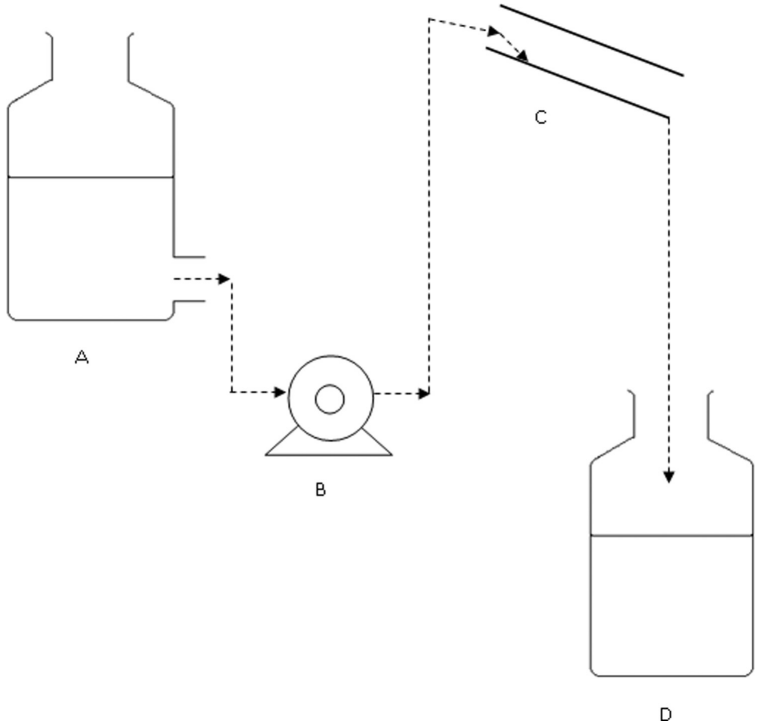
Mechanizm przechyłowy

Napęd za pomocą przekładni stożkowej

▼**M4**

Rysunek 2

Schemat przepływu



A: Zbiornik materiału doprowadzanego

B: Pompa perystaltyczna

C: Rurka obrotowa

D: Naczynie do zbierania odpływu

DEFINICJE

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Chemikalia: „Należy zauważyć, że termin »chemikalia« jest szeroko stosowany w porozumieniach UNCED i dokumentach powiązanych dla uwzględnienia substancji, produktów, mieszanin, preparatów i wszelkich innych terminów, które mogą być stosowane w istniejących systemach, by wskazać cały zakres”.

▼M6

C.11. BADANIE HAMOWANIA ODDYCHANIA OSADÓW CZYNNYCH (UTLENIANIE WĘGLA I AMONU)

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 209 (2010). W niniejszej metodzie badawczej opisano sposób określania wpływu danej substancji chemicznej na mikroorganizmy znajdujące się w osadzie czynnym (głównie bakterie) drogą pomiarów ich intensywności oddychania (utleniania węgla lub amonu) w określonych warunkach i w obecności różnych stężeń badanej substancji chemicznej. Przedmiotowa metoda badawcza opiera się na badaniu ETAD (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing industry) (1) i (2), na poprzedniej wytycznej OECD nr 209 (3) oraz na zmienionej normie PN-EN ISO 8192 (4). Celem badania jest określenie szybkich metod przesiewowych w celu oceny wpływu substancji chemicznych na mikroorganizmy znajdujące się w osadzie czynnym na etapie oczyszczania biologicznego (aerobowego) w oczyszczalniach ścieków. Wyniki badania mogą posłużyć jako wskaźnik odpowiednich niehamujących stężeń badanych substancji chemicznych, które mają zostać wykorzystane w różnych badaniach biodegradowalności (na przykład w rozdziałach C.4 A–F, C.9, C.10, C12 i C.29 niniejszego załącznika, OECD TG302C). W tym przypadku badanie można wykonać w formie badania przesiewowego, podobnego do badania ustalającego zakres stężeń lub badania granicznego stężenia (zob. pkt 39), uwzględniającego wyłącznie oddychanie w ujęciu ogólnym. W przypadku badań szybkiej biodegradowalności (rozdział C.4 lit. A–F i C.29 niniejszego załącznika), w których stężenie inokulum jest znacznie niższe niż wykorzystywane w niniejszej metodzie badawczej, do informacji tych należy jednak podchodzić ostrożnie. Brak zahamowania oddychania w tym badaniu oddychania de facto nie oznacza automatycznego wystąpienia warunków nieprowadzących do zahamowania w badaniu szybkiej biodegradowalności, opisanym w rozdziałach C.4 lit. A–F lub C.29 niniejszego załącznika.

2. Ogólnie rzecz biorąc wydaje się, że od czasu pierwszej publikacji na ten temat badanie hamowania oddychania było wykonywane z powodzeniem, chociaż w niektórych przypadkach odnotowano błędne wyniki, np. w (2) (4) (5). Krzywe obrazujące oddychanie w funkcji stężenia są niekiedy dwufazowe, wykresy zależności dawka-odpowiedź bywają zniekształcone, a wartości EC_{50} niespodziewanie niskie (5). Badania wykazały, że wyniki takie uzyskuje się, gdy osad czynny użyty w badaniach ulega znacznej nitryfikacji, a badana substancja chemiczna ma większy wpływ na utlenianie amonu niż na ogólne utlenianie w wyniku działalności organizmów heterotroficznych. Wspomniane błędne wyniki można zatem wyeliminować, wykonując dodatkowe badanie z wykorzystaniem specjalnego inhibitora nitryfikacji. Dokonując pomiaru wskaźników poboru tlenu w obecności takiego inhibitora, np. N-allilotiomocznika (ATU), i pod jego nieobecność, można obliczyć oddzielny, łączny pobór tlenu oraz pobór tlenu w procesach heterotroficznych i nitryfikacji (4) (7) (8). Można zatem określić działanie hamujące badanej substancji chemicznej na przedmiotowe dwa procesy, a wartości EC_{50} w odniesieniu do utleniania węgla organicznego (heterotroficzność) oraz utleniania amonu (nitryfikacja) można obliczyć w zwykły sposób. Należy zauważyć, że w pewnych rzadkich przypadkach działanie hamujące N-allilotiomocznika może być częściowo lub całkowicie zniesione w wyniku kompleksacji z badanymi substancjami chemicznymi lub suplementami występującymi w pożywce, np. jonami Cu^{++} (6). Jony Cu^{++} są niezbędne dla bakterii *Nitrosomonas*, ale w większym stężeniu są toksyczne.

3. Potrzeba nitryfikacji w tlenowym oczyszczaniu ścieków, stanowiąca niezbędny etap w procesie usuwania związków azotu ze ścieków w wyniku denitryfikacji do produktów gazowych, stała się nagląca szczególnie w państwach europejskich; UE ustaliła niższe limity stężenia azotu w oczyszczonych ściekach odprowadzanych do odbiorników wodnych ([1]).

([1]) Dyrektywa Rady 91/271/EWG z dnia 21 maja 1991 r. dotycząca oczyszczania ścieków komunalnych (Dz.U. L 135 z 30.5.1991, s. 40).

▼M6

4. W większości przypadków wystarczy sama metoda oceny wpływu na procesy utleniania węgla organicznego. W niektórych przypadkach do interpretacji wyników i zrozumienia skutków potrzebne jest jednak badanie wpływu na samą nitryfikację albo oddzielnie na nitryfikację i na utlenianie węgla organicznego.

ZASADA METODY BADANIA

5. Intensywność oddychania próbek osadu czynnego w ściekach syntetycznych mierzy się w zamkniętej komorze, która zawiera elektrodę tlenową, po czasie kontaktu wynoszącym trzy godziny. Uwzględniając realistyczny scenariusz narażenia, odpowiedni może być dłuższy czas kontaktu. Jeżeli badana substancja chemiczna ulega szybkiej degradacji, np. abiotycznie w drodze hydrolizy, lub jest lotna i nie można utrzymać odpowiedniego stężenia, można dodatkowo zastosować krótszy okres narażenia, wynoszący np. 30 minut. Wrażliwość każdej partii osadu czynnego należy sprawdzić w dniu narażenia za pomocą odpowiedniej substancji chemicznej odniesienia. Badanie stosuje się zazwyczaj do określenia EC_x (np. EC_{50}) badanej substancji chemicznej lub stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC).

6. Zahamowanie poboru tlenu przez mikroorganizmy utleniające węgiel organiczny można wyrazić niezależnie od zahamowania poboru tlenu przez mikroorganizmy utleniające amon, mierząc intensywność poboru tlenu pod nieobecność N-allilotiomocznika, który jest specjalnym inhibitorem utleniania amonu do azotynu przez bakterie nitryfikacyjne pierwszego stopnia, i w jego obecności. W tym przypadku procent zahamowania intensywności poboru tlenu oblicza się, porównując intensywność poboru tlenu w obecności badanej substancji chemicznej ze średnią intensywnością poboru tlenu odpowiednich prób kontrolnych niezawierających badanej substancji chemicznej, zarówno w obecności, jak i bez specjalnego inhibitora, tj. N-allilotiomocznika.

7. Pobór tlenu będący skutkiem procesów abiotycznych można wykryć, oznaczając intensywność poboru tlenu w mieszaninach badanej substancji chemicznej, pożywce ze ścieków syntetycznych oraz w wodzie, z pominięciem osadu czynnego.

INFORMACJE O BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

8. Dla potrzeb prawidłowej interpretacji wyników należy znać cechy badanej substancji chemicznej, takie jak identyfikacja (najlepiej numer CAS), nazwa (IUPAC), czystość, rozpuszczalność w wodzie, prężność pary, lotność i adsorpcja. Lotne substancje chemiczne nie mogą być zazwyczaj badane bez zastosowania specjalnych środków ostrożności (zob. pkt 21).

ZASTOSOWANIE METODY BADAWCZEJ

9. Metodę badawczą można zastosować do substancji chemicznych, które są rozpuszczalne w wodzie, słabo rozpuszczalne w wodzie lub lotne. Nie zawsze możliwe jest jednak otrzymanie wartości EC_{50} w odniesieniu do substancji chemicznych o ograniczonej rozpuszczalności, a ważne wyniki w odniesieniu do lotnych substancji chemicznych można otrzymać tylko pod warunkiem, że znaczna większość (na przykład > 80 %) badanej substancji chemicznej pozostanie w mieszaninie reakcyjnej pod koniec okresu (okresów) narażenia. W przypadku wystąpienia jakiejkolwiek niepewności co do stabilności badanej substancji chemicznej lub jej lotności, w celu bardziej precyzyjnego określenia stężenia EC_x należy przedstawić dodatkowe potwierdzające dane analityczne.

▼M6

SUBSTANCJE CHEMICZNE ODNIESIENIA

10. Substancje chemiczne odniesienia należy okresowo badać, aby zapewnić wiarygodność metody badawczej i warunków badania oraz w celu sprawdzenia wrażliwości każdej partii osadu czynnego wykorzystywanej w charakterze inokulum mikroorganizmów w dniu narażenia. Zaleca się stosowanie 3,5-dichlorofenolu (3,5-DCP) jako hamującej substancj chemicznej odniesienia, ponieważ jest on znanym inhibitorem oddychania i jest wykorzystywany w wielu typach badań hamowania/toksyczności (4). Jako substancję chemiczną odniesienia do całkowitego zahamowania oddychania można również wykorzystać pięciowodny siarczan miedzi (II) (9). N-metyloanilina może być wykorzystana jako specjalny inhibitor odniesienia nitryfikacji (4).

KRYTERIA WAŻNOŚCI I ODTWARZALNOŚĆ

11. Intensywność poboru tlenu w ślepych próbach kontrolnych (bez badanej substancji chemicznej i bez substancji chemicznej odniesienia) nie powinna być mniejsza niż 20 mg tlenu na jeden gram osadu czynnego (sucha masa zawiesiny) na godzinę. Jeżeli intensywność jest mniejsza, badanie należy powtórzyć, używając wypłukanego osadu czynnego lub osadu pochodzącego z innego źródła. Współczynnik zmienności intensywności poboru tlenu w kontrpróbach kontrolnych nie powinien być wyższy niż 30 % pod koniec ostatecznego badania.

12. W 2004 r. w międzynarodowym badaniu międzylaboratoryjnym zorganizowanym przez ISO (4), w którym wykorzystano osad czynny pochodzący ze ścieków domowych, wykryto, że EC_{50} dla 3,5-DCP wynosi 2–25 mg/l w przypadku oddychania ogółem, 5–40 mg/l w przypadku oddychania w procesach heterotroficznych i 0,1–10 mg/l w procesach nitryfikacji. Jeżeli w przypadku 3,5-DCP EC_{50} nie mieści się oczekiwanym zakresie, badanie należy powtórzyć, używając osadu czynnego z innego źródła. EC_{50} dla pięciowodnego siarczanu miedzi (II) powinno wynosić 53–155 mg/l w odniesieniu do oddychania ogółem (9).

OPIS METODY BADAWCZEJ

Naczynia badawcze i aparatura badawcza

13. Należy korzystać ze zwykłego sprzętu laboratoryjnego i następujących przyrządów:

a) naczyń badawczych – na przykład zlewek o pojemności 1 000 ml, w których znajduje się 500 ml mieszaniny reakcyjnej (zob. pkt 5 rys. 1);

b) komór i dodatkowych urządzeń służących do pomiaru stężenia rozpuszczonego tlenu; odpowiedniej elektrody tlenowej; zamkniętej komory, w której znajduje się próbka, bez fazy nadpowierzchniowej, z urządzeniem zapisującym (np. 7, 8 i 9, rys. 1 dodatek 2); ewentualnie można wykorzystać butelkę do oznaczania BZT z odpowiednią przystawką do uszczelniania elektrody tlenowej w szyjce butelki (zob. rys. 2 dodatek 3). Aby uniknąć strat cieczy wypartej przez wprowadzaną elektrodę tlenową, zaleca się uprzednio włożyć do butelki lejek lub szklaną rurkę albo użyć naczyń o wywiniętych krawędziach. W obu przypadkach należy skorzystać z mieszadła magnetycznego lub mieszadła opartego na alternatywnej metodzie, np. samomieszającej sondy;

c) mieszadeł magnetycznych i popychaczy, pokrytych obojętnym materiałem, które wykorzystywane są w komorze pomiarowej lub w naczyniach badawczych;

d) urządzenia napowietrzającego: w razie potrzeby sprężone powietrze należy przepuścić przez odpowiedni filtr w celu usunięcia pyłu i oleju i przez płuczki z wodą w celu nawilżenia go. Zawartość naczyń powinna być napowietrzana za pomocą pipet Pasteura lub innych urządzeń napowietrzających, które nie wchłaniają substancji chemicznych. Aby zaspokoić zapotrzebowania osadu na tlen i rozwiązać problemy z substancjami chemicznymi, które zbytnio się pienią, są lotne, a zatem tracone, lub które są trudne do rozproszenia w trakcie napowietrzenia tlenem, można wykorzystać wytrząsarkę orbitalną działającą przy prędkościach

▼M6

obrotowych w zakresie 150–250 obr./min z kolbami o pojemności np. 2 000 ml. Układ badawczy obejmuje zazwyczaj szereg napowietrzanych w sposób ciągły i kolejno nastawianych (np. w odstępach około 10–15 minut) zlewek, które są następnie kolejno analizowane. Można skorzystać również ze zweryfikowanej aparatury umożliwiającej jednoczesne napowietrzanie i pomiar intensywności zużycia tlenu w mieszaninach;

e) pehametru;

f) wirówki, wirówki stołowej ogólnego przeznaczenia do odwirowywania osadu, osiągającej przyspieszenie 10 000 m/s^2.

Odczynniki

14. Przez okres całego badania należy stosować odczynniki do analiz.

Woda

15. O ile nie określono, że można używać wody wodociągowej niezawierającej chloru, należy stosować wodę destylowaną lub dejonizowaną o zawartości rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) mniejszej niż 1 mg/l.

Pożywka ze ścieków syntetycznych

16. Pożywkę należy przygotować w taki sposób, aby zawierała następujące składniki w podanych ilościach:

— pepton 16 g;

— ekstrakt mięsa (lub porównywalny ekstrakt warzywny) 11 g;

— mocznik 3 g;

— chlorek sodu (NaCl) 0,7 g;

— chlorek wapnia dwuwodny ($CaC1_2$, $2H_2O$) 0,4 g;

— siarczan magnezu siedmiowodny ($MgSO_4$, $7H_2O$) 0,2 g;

— wodorofosforan potasu bezwodny (K_2HPO_4) 2,8 g;

— uzupełnić wodą destylowaną lub dejonizowaną do objętości 1 litra.

17. Wartość pH tego roztworu powinna wynosić 7,5 ± 0,5. Jeżeli przygotowana pożywka nie zostanie niezwłocznie wykorzystana, należy ją przechowywać bez dostępu światła w temperaturze 0–4 °C nie dłużej niż przez tydzień lub w warunkach, które nie spowodują żadnej zmiany w jej składzie. Należy zwrócić uwagę, że takie syntetyczne ścieki są 100 razy bardziej stężone niż ścieki opisane w sprawozdaniu technicznym OECD z dnia 11 czerwca 1976 r. „Proponowana metoda oceny biodegradacji substancji powierzchniowo czynnych używanych w detergentach syntetycznych”, a ponadto zawierają dodatek w postaci ortofosforanu dipotasu.

▼M6

18. Innym rozwiązaniem jest sterylizacja poszczególnych składników pożywki przed przechowywaniem albo dodanie peptonu lub ekstraktu mięsa tuż przed wykonaniem badania. Przed zastosowaniem należy dokładnie wymieszać pożywkę i w razie potrzeby wyregulować pH do 7,5 ± 0,5.

Badana substancja chemiczna

19. Roztwór podstawowy powinien być przygotowywany w odniesieniu do substancji badanych łatwo rozpuszczalnych w wodzie wyłącznie do poziomu maksymalnej rozpuszczalności w wodzie (osady są niedopuszczalne). Substancje słabo rozpuszczalne w wodzie, mieszaniny zawierające składniki o różnej rozpuszczalności w wodzie oraz substancje adsorpcyjne należy odmierzać bezpośrednio do naczyń badawczych. W tych przypadkach zastosowanie roztworów podstawowych może stanowić alternatywę, jeżeli rozpuszczone stężenie badanych substancji chemicznych jest określane analitycznie w naczyniach badawczych (przed dodaniem osadu czynnego). Jeżeli przygotowane zostały wodne frakcje, istotne jest również analityczne oznaczenie stężeń rozpuszczonych badanych substancji chemicznych w naczyniach badawczych. Należy unikać stosowania rozpuszczalników organicznych, środków dyspergujących/emulgatorów w celu zwiększenia rozpuszczalności. Można poddawać roztwory podstawowe działaniu ultradźwięków i wstępnie mieszać zawiesiny, np. w nocy, jeżeli dostępna jest wystarczająca ilość informacji na temat stabilności badanej substancji chemicznej w takich warunkach.

20. Badana substancja chemiczna może niekorzystnie wpływać na wskaźnik pH w układzie badawczym. Przed rozpoczęciem badania, podczas badania wstępnego, należy oznaczyć pH mieszanin poddawanych działaniu badanej substancji chemicznej w celu upewnienia się, czy przed badaniem głównym wymagane będzie wyregulowanie pH; czynność tę należy powtórzyć w dniu wykonywania badania głównego. W razie potrzeby przed dodaniem inokulum należy zneutralizować wodne roztwory/zawiesiny badanej substancji chemicznej. Ponieważ jednak neutralizacja może zmienić właściwości chemiczne substancji chemicznej, w zależności od celu badania można wykonać dalsze badania, aby ocenić wpływ badanej substancji chemicznej na osad bez regulowania pH.

21. Toksyczność lotnych substancji chemicznych, w szczególności w badaniach, w których przez układ jest przepuszczane powietrze, mogą spowodować występowanie zmiennych poziomów zmian spowodowanych utratą substancji chemicznej w okresie narażenia. Należy zachować ostrożność podczas pracy z takimi substancjami, przeprowadzając szczegółową analizę substancji w mieszaninach kontrolnych zawierających daną substancję i modyfikując schemat napowietrzania.

Substancja chemiczna odniesienia

22. Jeżeli jako substancja chemiczna odniesienia stosowany jest 3,5-dichlorofenol, należy przygotować roztwór 1,00 g 3,5-dichlorofenolu w 1 000 ml wody (15). W celu przyspieszenia procesu rozpuszczania należy użyć ciepłej wody lub ultradźwięków, a po schłodzeniu do temperatury pokojowej dopełnić do kreski. Należy jednak upewnić się, czy substancja chemiczna odniesienia nie zmieniła swojej struktury chemicznej. W razie potrzeby należy sprawdzić pH roztworu i skorygować je do wartości 7–8 za pomocą NaOH lub H_2SO_4.

23. Jeżeli w charakterze substancji chemicznej odniesienia stosowany jest pięciowodny siarczan miedzi (II), stosuje się stężenia 58 mg/l, 100 mg/l i 180 mg/l (o współczynniku 1,8). Substancję odmierza się bezpośrednio do naczyń badawczych (29 – 50 – 90 mg przy objętości całkowitej wynoszącej 500 ml). Następnie substancję rozcieńcza się 234 ml wody wodociągowej sterylizowanej w autoklawie. Pięciowodny siarczan miedzi (II) jest łatwo rozpuszczalny. Po rozpoczęciu badania dodaje się 16 ml ścieków syntetycznych i 250 ml osadu czynnego.

▼M6

Specjalny inhibitor nitryfikacji

24. Należy przygotować roztwór podstawowy N-allilotiomocznika (ATU) o stężeniu 2,32 g/l. Po dodaniu 2,5 ml tego roztworu podstawowego do mieszaniny inkubacyjnej o ostatecznej objętości 500 ml otrzymane stężenie końcowe wynosi 11,6 mg ATU/l (10^{-4}mol/l), o którym wiadomo, że jest wystarczające (4) do wywołania 100 % zahamowania nitryfikacji w osadzie czynnym o działaniu nitryfikacyjnym, zawierającym 1,5 g/l zawiesiny.

Abiotyczna próba kontrolna

25. W niektórych rzadkich przypadkach badana substancja chemiczna charakteryzująca się silnymi właściwościami redukującymi może spowodować wymierne abiotyczne zużycie tlenu. W takich przypadkach niezbędne są abiotyczne próby kontrolne w celu odróżnienia abiotycznego poboru tlenu przez badaną substancję chemiczną od oddychania mikroorganizmów. Abiotyczne próby kontrolne można przygotować, pomijając dodanie inokulum w mieszaninach stosowanych w badaniu. Podobnie można włączyć do badania abiotyczne próby kontrolne bez inokulum, gdy na etapie narażenia w trakcie badania wykonywane są pomocnicze analityczne pomiary otrzymanego stężenia, np. w przypadku stosowania roztworów podstawowych substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie, zawierających składniki o różnej rozpuszczalności w wodzie. W szczególnych przypadkach niezbędne może być przygotowanie abiotycznej próby kontrolnej z inokulum poddanym sterylizacji (np. w autoklawie lub za pomocą sterylizujących substancji toksycznych). Niektóre substancje chemiczne mogą wytwarzać tlen lub zużywać go jedynie w przypadku gdy powierzchnia jest wystarczająco duża, aby zaszła reakcja, nawet jeżeli zwykle wymagane są do tego dużo wyższa temperatura lub ciśnienie. W takim przypadku szczególną uwagę należy zwrócić na substancje nadtlenowe. Inokulum poddane sterylizacji zapewnia dużą powierzchnię.

Inokulum

26. Do zastosowania ogólnego osad czynny należy pobrać na wylocie komory napowietrzania lub w pobliżu wylotu komory prawidłowo działającej oczyszczalni ścieków, do której trafiają głównie ścieki domowe. W zależności od celu badania wykorzystać można również inne odpowiednie rodzaje lub źródła osadu czynnego, np. osad wyhodowany w laboratorium, o odpowiednich stężeniach zawiesiny wynoszących 2 g/l–4 g/l. Osady pochodzące z różnych oczyszczalni ścieków mogą jednak cechować się różnymi właściwościami i różną wrażliwością.

27. Można wykorzystać osad w takiej postaci, w jakiej został pobrany, ale należy usunąć cząsteczki gruboziarniste w drodze krótkotrwałej sedymentacji, np. przez 5–15 minut, oraz zdekantować górną warstwę drobniejszej zawiesiny lub przepuścić przez sito (np. o oczkach 1 mm^2). Innym rozwiązaniem jest homogenizacja osadu w wytrząsarce przez około 15 sekund lub dłużej, ale należy zachować ostrożność ze względu na siły tnące i zmianę temperatury, które mogą wystąpić w przypadku długich okresów homogenizacji.

28. Często konieczne jest płukanie osadu, np. w przypadku niskiej intensywności oddychania endogennego. Osad należy najpierw odwirowywać przez pewien okres, np. 10 minut z przyspieszeniem około 10 000 m/s^2, w celu wyprodukowania czystego supernatantu i osadu cząstek stałych zawartych w ściekach. Supernatant należy usunąć, a osad dodać do odchlorowanej wody wodociągowej, wstrząsając w celu ponownego uzyskania zawiesiny, a następnie usunąć wodę płuczącą przez ponowne odwirowanie i usunięcie. W razie potrzeby należy powtórzyć proces płukania i odwirowywania. Należy oznaczyć suchą masę znanej objętości osadu ponownie doprowadzonego do stanu zawiesiny oraz osadu zagęszczonego przez usunięcie cieczy lub mocniej rozcieńczyć ten osad w odchlorowanej wodzie wodociągowej

▼M6

w celu uzyskania odpowiedniego stężenia ciał stałych występujących w ściekach, wynoszącego 3 g/l. Osad czynny należy stale napowietrzać (np. 2 l/min) w temperaturze badania i w miarę możliwości wykorzystywać tylko w dniu pobrania. Jeżeli nie jest to możliwe, do osadu należy codziennie doprowadzać pożywkę ze ścieków syntetycznych (50 ml pożywki ścieków syntetycznych/litr osadu czynnego) przez dwa dodatkowe dni. Osad wykorzystuje się następnie w badaniu, a wyniki akceptuje jako ważne, pod warunkiem że nie nastąpiła żadna znaczna zmiana w jego aktywności, oceniona na podstawie intensywności oddychania endogennego osadu, oddychania w procesach heterotroficznych i nitryfikacji.

29. Trudności mogą pojawić się w przypadku pienienia się podczas inkubacji, które będzie tak intensywne, że piana i ciała stałe zawarte w ściekach zostaną wypchnięte z naczyń napowietrzających. W niektórych przypadkach pojawienie się piany może po prostu wynikać z obecności ścieków syntetycznych, ale należy je przewidzieć, jeżeli badana substancja chemiczna jest surfaktantem lub zawiera go w swoim składzie. Utrata części stałych osadu z mieszanin stosowanych w badaniu będzie skutkowała sztucznie obniżoną intensywnością oddychania, która może zostać błędnie zinterpretowana jako skutek zahamowania. Ponadto napowietrzanie roztworu surfaktantu powoduje, że surfaktant gromadzi się w warstwie piany; ubytek piany z układu badawczego spowoduje obniżenie stężeń ekspozycyjnych. Pienienie można eliminować, stosując proste mechaniczne sposoby (np. mieszając od czasu do czasu ręczne za pomocą szklanej pałeczki) lub przez dodanie wolnej od surfaktantu substancji przeciwpianotwórczej w postaci silikonowej emulsji, lub stosując napowietrzanie przez wstrząsanie kolby. Jeżeli problem jest powiązany z obecnością ścieków syntetycznych, skład ścieków należy zmodyfikować, dodając odczynnik przeciwpianotwórczy w ilości np. 50 ml/l. Jeżeli pienienie powoduje badana substancja chemiczna, ilość niezbędną do zredukowania tego efektu należy określić dla maksymalnego badanego stężenia, a następnie identycznie postępować należy w przypadku wszystkich naczyń napowietrzających (w tym np. ślepych prób kontrolnych lub naczyń z substancją odniesienia, w których nie ma piany). Jeżeli zastosowane zostały substancje przeciwpianotwórcze, nie może dochodzić do interakcji z inokulum lub z badaną substancją chemiczną.

PROCEDURA BADANIA

30. Można oznaczyć zahamowanie trzech różnych procesów poboru tlenu: całkowitego, tlenu pobieranego przez mikroorganizmy heterotroficzne i poboru tlenu w wyniku nitryfikacji. Zazwyczaj wystarczający powinien być pomiar zahamowania całkowitego poboru tlenu. Określenie wpływu na pobór tlenu przez mikroorganizmy heterotroficzne w wyniku utleniania węgla organicznego oraz w wyniku utleniania amoniaku jest potrzebne, jeżeli istnieje szczególny wymóg dotyczący takich dwóch oddzielnych punktów końcowych w odniesieniu do danej substancji chemicznej lub (opcjonalnie) w celu wyjaśnienia nietypowych krzywych dawka-odpowiedź wynikających z hamowania całkowitego poboru tlenu.

Warunki badania

31. Badanie należy przeprowadzić w temperaturze mieszczącej się w granicach 20 ± 2 °C.

Mieszaniny stosowane w badaniu

32. W celu uzyskania różnych stężeń nominalnych badanej substancji chemicznej (zob. przykład objętości składników w tabeli 1) należy przygotować stosowane w badaniu mieszaniny (F_T jak w tabeli 1) zawierające wodę, pożywkę ze ścieków syntetycznych i badaną substancję chemiczną. W razie potrzeby pH należy skorygować do poziomu 7,5 ± 0,5; mieszaniny należy rozcieńczyć wodą i dodać inokulum w celu uzyskania jednakowych końcowych objętości w naczyniach i rozpoczęcia napowietrzania.

Mieszaniny odniesienia

33. Mieszaniny (F_R) należy sporządzić w taki sam sposób jak mieszaniny stosowane w badaniu, zastępując badaną substancję chemiczną substancją chemiczną odniesienia np. 3,5-dichlorofenolem.

▼M6

Ślepe próby kontrolne

34. Ślepe próby kontrolne (F_B) należy przygotować na początku i na końcu okresu narażenia w badaniach, w których zlewki do badania nastawia się kolejno w pewnych odstępach czasu. W badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem urządzeń umożliwiających wykonanie jednoczesnych pomiarów zużycia tlenu, do każdej jednocześnie analizowanej partii należy dołączyć co najmniej dwie ślepe próby kontrolne. Ślepe próby kontrolne zawierają taką samą objętość osadu czynnego i syntetycznej pożywki, ale nie zawierają badanej substancji chemicznej ani substancji chemicznej odniesienia. Należy rozcieńczyć je wodą do takiej samej objętości jak mieszaniny stosowane w badaniu i mieszaniny odniesienia.

Abiotyczna próba kontrolna

35. W razie potrzeby, na przykład jeżeli wiadomo lub istnieje podejrzenie, że badana substancja chemiczna ma silne właściwości redukujące, należy przygotować mieszaninę F_A do pomiaru abiotycznego zużycia tlenu. Mieszanina powinna zawierać takie same ilości badanej substancji chemicznej, pożywki ze ścieków syntetycznych oraz mieć taką samą objętość jak mieszaniny stosowane w badaniu, ale nie powinna zawierać osadu czynnego.

Ogólna procedura i pomiary

36. Mieszaniny stosowane w badaniu, mieszaniny odniesienia oraz ślepe i abiotyczne próby kontrolne inkubuje się w temperaturze badania w warunkach wymuszonego napowietrzania (0,5–1 l/min) w celu utrzymania stężenia rozpuszczonego tlenu powyżej 60–70 % nasycenia oraz w celu utrzymania kłaczków osadu w zawieszeniu. Mieszanie kultur jest również konieczne w celu utrzymania kłaczków osadu w zawieszeniu. Inkubację uznaje się za rozpoczętą w momencie początkowego kontaktu inokulum z osadu czynnego z innymi składnikami końcowej mieszaniny. Pod koniec inkubacji, po określonych okresach narażenia, wynoszących zazwyczaj 3 godziny, pobiera się próbki w celu wykonania pomiaru tempa spadku stężenia rozpuszczonego tlenu w przeznaczonej do tego celu komorze (rys. 2 dodatek 3) lub w całkowicie wypełnionej butelce do oznaczania BZT. Sposób, w jaki rozpoczynają się inkubacje zależy także od wydajności urządzeń wykorzystywanych do mierzenia poziomów zużycia tlenu. Jeżeli na przykład jest to jedna sonda tlenowa, pomiary wykonuje się indywidualnie. W tym przypadku należy przygotować różne mieszaniny niezbędne do przeprowadzenia badania w ściekach syntetycznych, ale należy wstrzymać wprowadzanie inokulum i do każdego naczynia w serii dodawać należy wymagane porcje osadu. Każdą inkubację należy rozpoczynać na po kolei w dogodnych odstępach czasu, np. 10–15 minut. Innym rozwiązaniem jest zastosowanie układu pomiarowego składającego się z wielu sond umożliwiających wielokrotne jednoczesne pomiary; w tym przypadku inokulum można dodać w tym samym czasie do odpowiednich grup naczyń.

37. Stężenie osadu czynnego we wszystkich mieszaninach stosowanych w badaniu, mieszaninach odniesienia i w ślepych próbach kontrolnych (ale nie w abiotycznych próbach kontrolnych) wynosi nominalnie 1,5 g/l zawiesiny. Zużycie tlenu należy zmierzyć po 3 godzinach narażenia. W razie potrzeby po 30 minutach narażenia należy wykonać dodatkowe pomiary zgodnie z wcześniejszym opisem w pkt 5.

Nitryfikacyjny potencjał osadu

38. W celu dokonania oceny, czy osad ulegnie nitryfikacji, a jeśli tak, to w jakim stopniu, należy sporządzić mieszaniny (F_B), takie jak ślepa próba kontrolna i dodatkowe mieszaniny kontrolne (F_N), które jednak zawierają

▼M6

również N-allilotiomocznik w ilości 11,6 mg/l. Mieszaniny należy napowietrzać i inkubować w temperaturze 20° ± 2 °C przez 3 godziny. Następnie zmierzyć należy poziomy poboru tlenu i obliczyć poziom poboru tlenu związany z nitryfikacją.

Projekty badania

Badanie ustalające zakres stężeń

39. W razie potrzeby przeprowadza się badanie wstępne w celu oszacowania zakresu stężeń badanej substancji chemicznej potrzebnych w badaniu ostatecznym, aby oznaczyć zahamowanie zużycia tlenu. Ewentualny brak zahamowania zużycia tlenu przez badaną substancję chemiczną w badaniu wstępnym może wskazywać na brak konieczności wykonania badania ostatecznego, ale należy włączyć do badania trzy próby z najwyższymi badanymi stężeniami ze wstępnego badania (zazwyczaj 1 000 mg/l, ale zależy to od wymaganych danych).

Tabela 1

Przykłady mieszanin stosowanych w badaniu wstępnym

Odczynnik	Pierwotne stężenie				
Roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej	10 g/l				
Roztwór podstawowy syntetycznej pożywki	Zob. pkt 16				
Zawiesina podstawowa osadu czynnego	3 g/l zawiesiny				
Składniki mieszanin	Dozowanie do naczyń badawczych [a]				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej (ml) (pkt 19–21)	0,5	5	50	0	50
Roztwór podstawowy pożywki ze ścieków syntetycznych (ml) (pkt 16)	16	16	16	16	16
Zawiesina osadu czynnego (ml) (pkt 26–29)	250	250	250	250	0
Woda (pkt 15)	233,5	229	184	234	434
Łączna objętość mieszanin (ml)	500	500	500	500	500
Stężenia w mieszaninie					
Badana zawiesina (mg/l) Osad czynny	10	100	1 000	0	1 000
(zawiesina) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

[a] Tę samą procedurę należy powtórzyć z chemiczną substancją odniesienia, aby uzyskać kolby F_{R1-3}.

40. Badanie należy przeprowadzić, stosując co najmniej trzy stężenia badanej substancji chemicznej, na przykład 10 mg/l, 100 mg/l i 1 000 mg/l ze ślepą próbą kontrolną oraz, w razie potrzeby, co najmniej trzy abiotyczne próby kontrolne z najwyższymi stężeniami badanej substancji chemicznej (zob. jako przykład tabelę 1). Najlepiej byłoby, gdyby najniższe stężenie nie

▼M6

miało żadnego wpływu na zużycie tlenu. W stosownych przypadkach należy obliczyć intensywność poboru tlenu i nitryfikacji; następnie należy obliczyć procentową wartość zahamowania. W zależności od celu badania można również w prosty sposób oznaczyć toksyczność stężenia granicznego, np. 1 000 mg/l. Jeżeli przy tym stężeniu nie wystąpi żadne istotne statystycznie toksyczne działanie, dalsze badanie wyższych lub niższych stężeń nie jest konieczne. Należy zauważyć, że substancje słabo rozpuszczalne w wodzie, mieszaniny zawierające składniki o różnej rozpuszczalności w wodzie oraz substancje adsorpcyjne należy odważać bezpośrednio do naczyń badawczych. W tym przypadku objętość zarezerwowaną dla roztworu podstawowego substancji badanej należy zastąpić wodą do rozcieńczania.

Badanie ostateczne

Hamowanie całkowitego poboru tlenu

41. Badanie należy przeprowadzić, stosując szereg stężeń określonych na podstawie wstępnego badania. Aby otrzymać wartości NOEC i EC_x (np. EC_{50}), w większości przypadków zaleca się stosowanie sześciu prób kontrolnych i pięciu badanych stężeń uporządkowanych w szereg geometryczny z pięcioma kontrpróbami. Nie ma konieczności powtarzania abiotycznej próby kontrolnej, jeżeli w badaniu wstępnym tlen nie został pobrany, jednak w przypadku znacznego poboru tlenu należy uwzględnić abiotyczne próby kontrolne w odniesieniu do każdego stężenia badanej substancji chemicznej. Wrażliwość osadu należy sprawdzić, wykorzystując do tego celu chemiczną substancję odniesienia, jaką jest 3,5-dichlorofenol. Wrażliwość osadu należy sprawdzać w każdej badanej serii, ponieważ wiadomo, że jest ona zmienna. We wszystkich przypadkach próbki usuwa się z naczyń badawczych po 3 godzinach, i w razie potrzeby po dodatkowych 30 minutach w celu pomiaru intensywności poboru tlenu w komorze z elektrodą tlenową. Na podstawie zebranych danych oblicza się szczegółowe wartości intensywności oddechowej w próbach kontrolnych i mieszaninach użytych w badaniu; następnie oblicza się procentową wartość zahamowania z poniższego równania 7.

Odróżnianie zahamowania oddychania organizmów heterotroficznych od nitryfikacji

42. Wykorzystanie specjalnego inhibitora nitryfikacji ATU umożliwia bezpośrednią ocenę działania hamującego badanej substancji chemicznej na utlenianie heterotroficzne i odejmując intensywność poboru tlenu w obecności ATU od całkowitego poziomu poboru (bez ATU) można obliczyć intensywność nitryfikacji. Zgodnie z projektami badań EC_x lub NOEC opisanymi w pkt 41 należy przygotować dwa zestawy mieszanin reakcyjnych, ale dodatkowo do wszystkich mieszanin jednego zestawu należy dodać ATU w końcowym stężeniu 11,6 mg/l, w przypadku którego wykazano działanie całkowicie hamujące nitryfikację w osadzie z zawiesiną o stężeniach do 3 000 mg/l (4). Intensywności poboru tlenu należy mierzyć po okresie narażenia; te bezpośrednie wartości są jedynie wskaźnikami oddychania organizmów heterotroficznych, a różnice między tymi wartościami i odpowiadającymi im całkowitymi wskaźnikami intensywności oddechowej określają nitryfikację. Następnie oblicza się różne stopnie zahamowania.

Pomiary

43. Po okresach narażenia próbkę z pierwszego naczynia do napowietrzania należy przenieść do komory z elektrodą tlenową (rys. 1 dodatek 2) i natychmiast zmierzyć stężenie rozpuszczonego tlenu. Jeżeli dostępny jest układ składający się z wielu elektrod, wówczas pomiary można wykonać jednocześnie. Istotne jest, aby tempo mieszania (za pomocą powlekanego magnesu) było takie samo jak podczas kalibracji elektrody, aby zapewnić minimalne opóźnienie odpowiedzi sondy na zmieniające się stężenia tlenu oraz umożliwić dokonywanie regularnych i odtwarzalnych pomiarów tlenu

▼M6

w naczyniu pomiarowym. Zazwyczaj wystarczający jest system sondy samomieszającej niektórych elektrod tlenowych. Pomiędzy pomiarami komorę należy przepłukiwać wodą. Innym rozwiązaniem jest wykorzystanie próbki do napełnienia butelki do oznaczania BZT (rys. 2 dodatek 3) wyposażonej w mieszadło magnetyczne. Sondę tlenową z przystawką należy następnie umieścić w szyjce butelki i włączyć magnetyczne mieszadło. W obydwu przypadkach stężenie rozpuszczonego tlenu należy mierzyć i rejestrować w sposób ciągły zazwyczaj przez 5–10 minut lub do momentu, gdy stężenie tlenu spadnie poniżej 2 mg/l. Elektrodę należy usunąć, mieszaninę umieścić z powrotem w naczyniu napowietrzającym i kontynuować napowietrzanie i mieszanie, jeżeli konieczne jest wykonanie pomiaru po dłuższych okresach narażenia.

Weryfikacja stężenia badanej substancji chemicznej

44. Do niektórych celów konieczne może być zmierzenie stężenia badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych. Należy zauważyć, że jeżeli zastosowano roztwory podstawowe:

— substancji słabo rozpuszczalnych w wodzie,

— mieszanin składników o różnej rozpuszczalności w wodzie lub

— substancji o dobrej rozpuszczalności w wodzie, ale w przypadku których stężenie roztworu podstawowego jest zbliżone do maksymalnej rozpuszczalności w wodzie,

frakcja, która uległa rozpuszczeniu, jest nieznana, i nie jest znane rzeczywiste stężenie badanej substancji chemicznej przenoszonej do naczyń badawczych. W celu scharakteryzowania narażenia konieczne jest analityczne oszacowanie stężeń badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych. Aby uprościć to zadanie, analityczne oszacowanie należy przeprowadzić przed dodaniem inokulum. Ze względu na fakt, że do naczyń badawczych zostaną przeniesione tylko rozpuszczone frakcje, zmierzone stężenia mogą być bardzo niskie.

45. Aby uniknąć czasochłonnych i kosztownych analiz laboratoryjnych, zaleca się po prostu odważyć badaną substancję chemiczną bezpośrednio do naczyń badawczych i w późniejszych obliczeniach przyjmować stężenie nominalne odważonej pierwotnie substancji. Odróżnienie rozpuszczonych, nierozpuszczonych lub adsorbowanych frakcji badanej substancji chemicznej nie jest konieczne, ponieważ wszystkie te frakcje występują w naturalnych warunkach również w oczyszczalni ścieków i mogą się różnić w zależności od składu ścieków. Celem niniejszej metody badawczej jest realistyczne oszacowanie stężenia, które nie wykazuje działania hamującego; metoda nie nadaje się do szczegółowego badania, które frakcje przyczyniają się do hamowania procesów oddychania organizmów żyjących w osadzie czynnym. Ponadto substancje adsorpcyjne również należy odważyć bezpośrednio do naczyń badawczych, które powinny być wykonane ze szkła silanizowanego, aby ograniczyć do minimum straty powodowane przez adsorpcję.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Obliczenie intensywności poboru tlenu

46. Intensywność poboru tlenu należy obliczyć ze średniej wartości pomiarowych np. z liniowej części wykresów stężenia tlenu w funkcji czasu, ograniczając się do obliczenia stężeń tlenu w zakresie 2,0–7,0 mg/l, ponieważ wyższe i niższe stężenia mogą jako takie wpływać na intensywność zużycia. Od czasu do czasu próba określenia wartości powyżej lub poniżej tego zakresu stężenia jest nieunikniona i konieczna, na przykład gdy oddychanie jest w znacznym stopniu zahamowane i w związku z tym bardzo powolne lub jeżeli w przypadku konkretnego osadu czynnego proces oddychania zachodzi bardzo szybko. Jest to dopuszczalne, pod warunkiem że fragmenty wykresu poboru tlenu poza zakresem są proste, a ich gradienty nie ulegają

▼**M6**

zmianie, gdy przechodzą przez graniczne wartości 2,0 mg/l lub 7,0 mg/l O_2. Wszystkie zakrzywione fragmenty wykresu wskazują na stabilizowanie się systemu pomiarowego lub zmianę intensywności poboru tlenu i nie należy ich wykorzystywać w celu obliczania intensywności oddychania. Intensywność poboru tlenu należy podać w miligramach na litr na godzinę (mg/lh) lub w miligramach na gram suchego osadu na godzinę (mg/gh). Intensywność zużycia tlenu R w mg/lh można obliczyć lub interpolować z liniowego fragmentu wykresu zarejestrowanego spadku zawartości tlenu zgodnie z równaniem 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

gdzie:

Q_1 jest to stężenie tlenu na początku wybranej sekcji fazy liniowej (mg/l);

Q_2 jest to stężenie tlenu na końcu wybranej sekcji fazy liniowej (mg/l);

Δ_t jest to odstęp czasu pomiędzy tymi dwoma pomiarami (min).

47. Właściwą intensywność oddychania (R_s) wyraża się jako ilość tlenu zużytą na g suchej masy osadu na godzinę (mg/gh) zgodnie z równaniem 2:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

gdzie SS stanowi stężenie zawiesiny w mieszaninie użytej w badaniu (g/l).

48. Różne indeksy R, które można łączyć, to:

S właściwa intensywność

T całkowita intensywność oddychania

N intensywność wynikająca z nitryfikacji

H intensywność wynikająca z działalności organizmów heterotroficznych

A intensywność wynikająca z procesów abiotycznych

B intensywność oparta na ślepych próbach (średnia)

Obliczenie intensywności poboru tlenu wynikającego z nitryfikacji

49. Związek między całkowitym oddychaniem (R_T), oddychaniem związanym z nitryfikacją (R_N) i oddychaniem organizmów heterotroficznych (R_H) określa równanie 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

gdzie:

R_N to intensywność poboru tlenu wynikającego z nitryfikacji (mg/lh);

R_T to zmierzona intensywność poboru tlenu w ślepej próbie kontrolnej (brak ATU; F_B) (mg/lh).

R_H to zmierzona intensywność poboru tlenu w ślepej próbie kontrolnej po dodaniu ATU (F_N) (mg/lh).

▼M6

50. Ta zależność jest ważna w przypadku wartości ślepych prób (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abiotycznych grup kontrolnych (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) oraz prób z badaną substancją chemiczną (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Właściwą intensywność oddychania oblicza się z:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Jeżeli wielkość R_N jest nieznaczna (np. < 5 % R_T w ślepych próbach kontrolnych) w badaniu wstępnym, można założyć, że pobór tlenu przez organizmy heterotroficzne jest równy całkowitemu poborowi i nie zachodzi nitryfikacja. Gdyby badania miały na celu ocenę wpływu na mikroorganizmy heterotroficzne i nitryfikacyjne, potrzebne byłoby inne źródło osadu czynnego. Badanie ostateczne przeprowadza się, jeżeli nie ma dowodów na hamowanie intensywności poboru tlenu przy innych stężeniach badanych substancji chemicznych.

Obliczenie procentu zahamowania

52. Procent zahamowania całkowitego zużycia tlenu, I_T, dla każdego stężenia badanej substancji chemicznej opisany jest równaniem 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. Podobnie procent zahamowania poboru tlenu przez organizmy heterotroficzne, I_H, dla każdego stężenia badanej substancji chemicznej opisany jest równaniem 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8)$$

54. Ponadto zahamowanie poboru tlenu spowodowane nitryfikacją, I_N, dla każdego stężenia opisane jest równaniem 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. Procentowe zahamowanie poboru tlenu należy wykreślić w funkcji logarytmu stężenia badanej substancji chemicznej (krzywa zahamowania, zob. rys 3 dodatek 4). Krzywe zahamowania wyznacza się dla każdego okresu 3 godzin lub dodatkowo po 30 min. Stężenie badanej substancji chemicznej, które powoduje hamowanie poboru tlenu o 50 % (EC_{50}), należy obliczyć lub interpolować z wykresu. Jeżeli dostępne są odpowiednie dane, można obliczyć lub interpolować granice ufności na poziomie 95 % EC_{50}, nachylenie krzywej oraz odpowiednie wartości umożliwiające oznaczenie rozpoczęcia zahamowania (na przykład EC_{10} lub EC_{20}) i zakończenie zakresu zahamowania (na przykład EC_{80} lub EC_{90}).

56. Należy zauważyć, że w obliczu zmienności obserwowanej często w wynikach, w wielu przypadkach wystarczające może okazać się dodatkowe wyrażenie wyników w rzędzie wielkości na przykład:

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} 1 mg/l – 10 mg/l

EC_{50} 10 mg/l – 100 mg/l

EC_{50} > 100 mg/l

Interpretacja wyników

EC_x

▼M6

57. Wartości EC_x, w tym ich powiązane dolne i górne granice ufności na poziomie 95 % w odniesieniu do parametru, oblicza się za pomocą odpowiednich metod statystycznych (np. analizy probitowej, krzywej logistycznej, funkcji Weibulla, uproszczonej metody Spearmana-Kärbera lub zwykłej interpolacji (11)). EC_x otrzymuje się, wstawiając wartość odpowiadającą x % średniej grupy kontrolnej do wybranego równania. Aby obliczyć EC_{50} lub każdą inną wartość EC_x, należy przeprowadzić analizę regresyjną średnich (x) z okresu przed wprowadzeniem substancji chemicznej.

Oszacowanie NOEC

58. Jeżeli analiza statystyczna ma na celu wyznaczenie NOEC, niezbędne są dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyń (poszczególne naczynia uznaje się za kontrpróby). Odpowiednie metody statystyczne należy stosować zgodnie z dokumentem OECD „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application" (11). Ogólnie rzecz biorąc, niekorzystne skutki podania badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną bada się, stosując test jednostronnej (mniejszej) hipotezy na poziomie $p \leq 0{,}05$.

Sprawozdanie z badania

59. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna, numer CAS, czystość;

— właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej (np. log K_{ow}, rozpuszczalność w wodzie, prężność pary, stała Henry'ego (H) i ewentualne informacje na temat losów badanej substancji chemicznej, np. adsorpcji przez osad czynny).

Układ badawczy

— źródło, warunki działania oczyszczalni ścieków i odprowadzane do niej ścieki, stężenie, wstępna obróbka i przechowywanie osadu czynnego.

Warunki badania

— temperatura badania, pH w trakcie badania oraz czas trwania faz narażenia.

Wyniki

— specyficzne zużycie tlenu w grupach kontrolnych (mg O2/(g osad × h);

— wszystkie zmierzone dane, krzywe zahamowania oraz metoda obliczania EC50;

— EC_{50} oraz w miarę możliwości granice ufności na poziomie 95 %, ewentualnie EC20, EC_{80}; ewentualnie NOEC i zastosowane metody statystyczne, jeżeli nie można określić EC_{50};

— wyniki zahamowania całkowitego oraz w stosownych przypadkach zahamowania oddychania organizmów heterotroficznych i nitryfikacyjnych;

— abiotyczny pobór tlenu w fizyko-chemicznej grupie kontrolnej (jeżeli została użyta);

— nazwa chemicznej substancji odniesienia i wyniki badań z użyciem tej substancji chemicznej;

— wszelkie uwagi i odstępstwa od standardowej procedury, które mogły wpłynąć na wynik.

BIBLIOGRAFIA

(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, Paryż.

(4) ISO (2007). ISO 8192 Jakość wody – Badanie hamowania zużycia tlenu przez osad czynny do utleniania związków zawierających węgiel i amon, Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna.

(5) Bealing, D. J. (2003). Dokument ISO/TC147/WGI/N.183, Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna.

(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 Jakość wody – Wytyczne dotyczące przygotowania i obróbki słabo rozpuszczalnych związków organicznych w celu oceny ich biodegradacji w środowisku wodnym, Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna.

(11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paryż.

▼**M6**

Dodatek 1

Definicje

Do niniejszej metody badawczej mają zastosowanie podane poniżej definicje.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

ECx (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływu na organizmy użyte do badania w danym okresie narażenia, w porównaniu z próbą kontrolną. Na przykład EC_{50} jest stężeniem, które w przybliżeniu ma wpływ na punkt końcowy badania w 50 % narażonej populacji w określonym okresie narażenia.

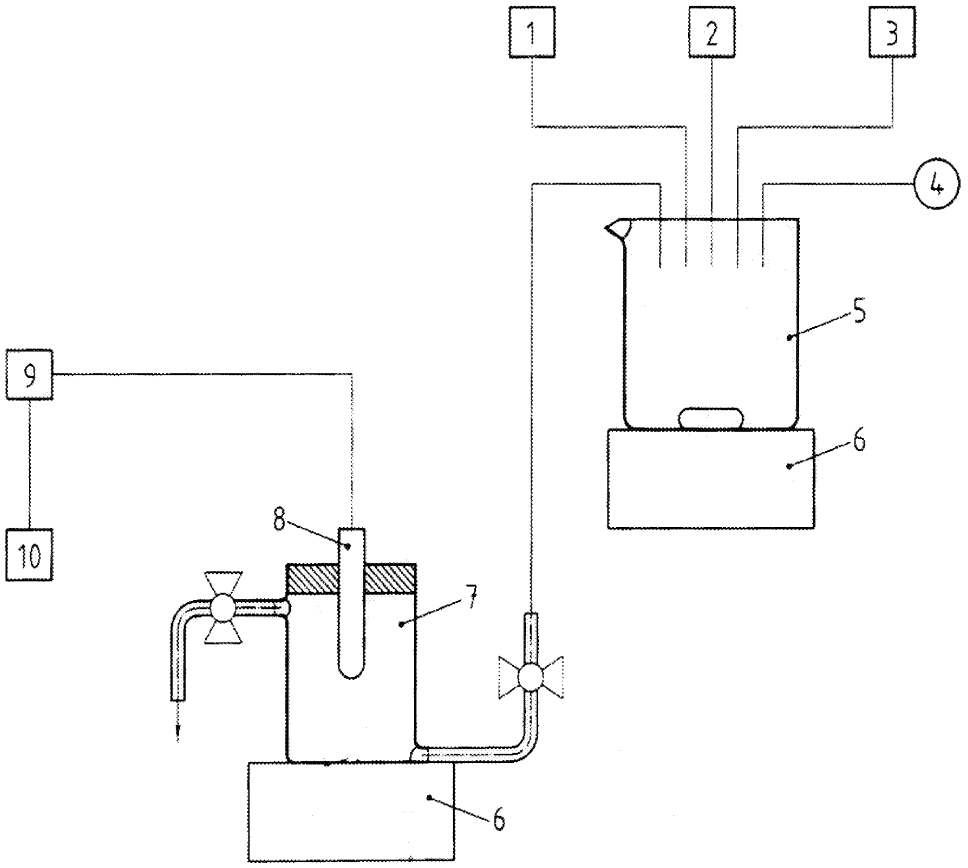
NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian) oznacza stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym nie obserwuje się żadnych zmian. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające NOEC nie ma statystycznie istotnego skutku ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia, jeżeli porówna się je z próbą kontrolną.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼**M6**

Dodatek 2

Rys. 1: **Przykłady układu pomiarowego**



Legenda

1 osad czynny

2 pożywka syntetyczna

3 badana substancja chemiczna

4 powietrze

5 naczynie do mieszania

6 mieszadło magnetyczne

7 komora do pomiaru zmian stężenia tlenu

8 elektroda tlenowa

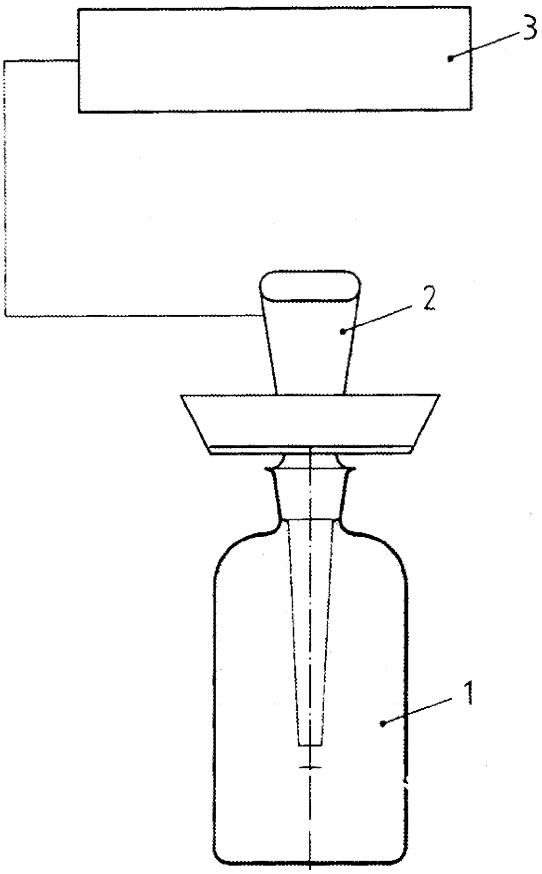
9 przyrząd do pomiaru stężenia tlenu

10 rejestrator

▼**M6**

Dodatek 3

Rys. 2: **Przykład układu pomiarowego z zastosowaniem butelki do oznaczania BZT**



Legenda

1 naczynie badawcze

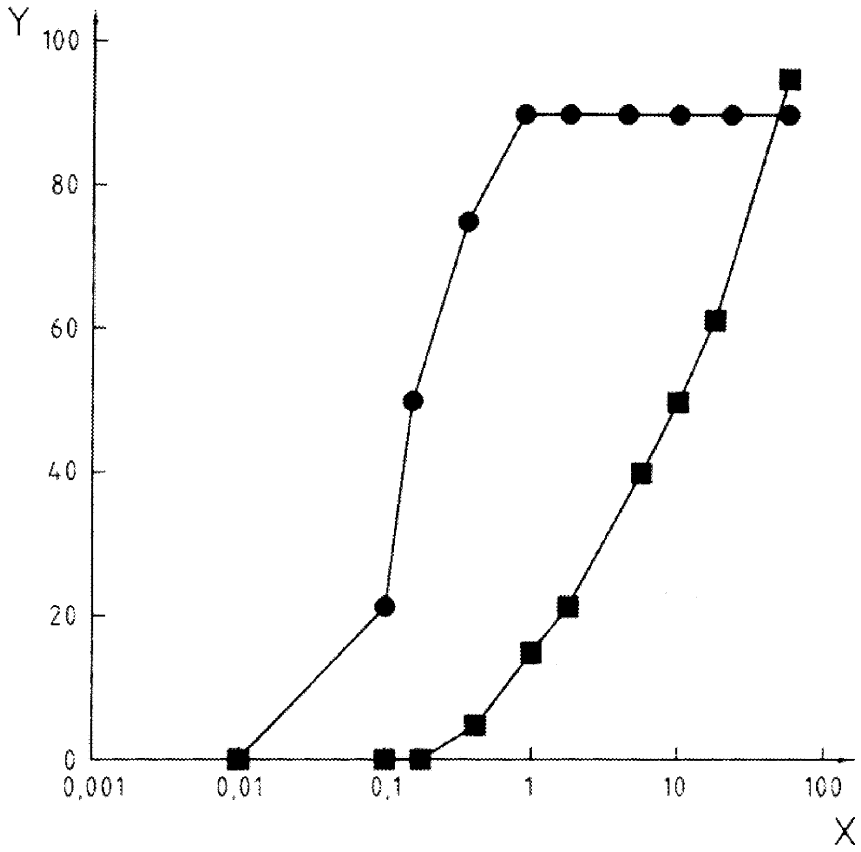
2 elektroda tlenowa

3 przyrząd do pomiaru stężenia tlenu

▼**M6**

Dodatek 4

Rys. 3: **Przykład krzywych zahamowania**



Legenda

X stężenie 3,5-dichlorofenolu (mg/l)

Y zahamowanie (%)

■ zahamowanie oddychania organizmów heterotroficznych przy zastosowaniu osadu nitryfikującego

● zahamowanie nitryfikacji przy zastosowaniu osadu nitryfikującego.

▼B

C.12. BIODEGRADACJA

ZMODYFIKOWANE BADANIE SCAS

1. METODA

1.1. WSTĘP

Celem metody jest ocena wpływu całkowitej biodegradacji rozpuszczalnych w wodzie, nielotnych substancji organicznych, w przypadku ich ekspozycji na stosunkowo wysokie stężenia drobnoustrojów przez długi okres czasu. Żywotność drobnoustrojów utrzymywana jest przez ten okres, codziennie dodając zasiedloną pożywkę szlamową. (Odnośnie do wymogów związanych z przerwą weekendową, ścieki można przechowywać w temperaturze 4 ^{o}C. W związku z tym można użyć syntetycznych ścieków (test potwierdzający OECD).

Może mieć miejsce fizyczna i chemiczna adsorpcja zawieszonych substancji stałych, co należy wziąć pod uwagę przy interpretacji wyników (zob. 3.2).

Z powodu długiego okresu zatrzymania fazy płynnej (36 godzin) i nieregularnego dodawania odżywek badanie nie pozoruje faktycznych warunków występujących w oczyszczalni ścieków. Wyniki otrzymane z różnymi substancjami testowymi oznaczają, iż badanie wykazuje wysoki wpływ biodegradacyjny.

Warunki stworzone w badaniu wysoce sprzyjają wyborowi i/lub przystosowaniu drobnoustrojów zdolnych do degradacji badanego związku. (Procedurę można również wykorzystać w celu wytworzenia zaaklimatyzowanego inokulum mogącego być zastosowanym w innych badaniach).

W metodzie tej pomiar stężenia rozwiązanego węgla organicznego lub chemicznego zapotrzebowania tlenu wykorzystywany jest w celu określenia całkowitej biodegradacji substancji testowej. Najlepiej ustalać DOC po zakwaszeniu i oczyszczeniu niż jako różnicę $C_{całkowite} - C_{nieorganiczne}$.

Równoczesne zastosowanie szczególnej metody analitycznej może umożliwić ocenę podstawowej biodegradacji substancji (zanik pierwotnej budowy chemicznej).

Metodę stosuje się jedynie w odniesieniu do tych organicznych substancji testowych, które przy wielkości stężenia użytego w badaniu:

— są rozpuszczalne w wodzie (przy co najmniej 20 ml rozpuszczonego węgla organicznego/litr),

— posiadają nieznaczne ciśnienie pary,

— nie hamują bakterii,

— nie są znacznie absorbowane w badanym systemie,

— nie są tracone w wyniku wytwarzania piany z badanego roztworu.

Należy ustalić zawartość węgla w organicznym materiale testowym.

▼B

Informacje dotyczące względnych części składowych materiału testowego będą użyteczne przy interpretacji otrzymanych wyników, w szczególności w tych przypadkach gdzie wyniki są na niskim poziomie lub marginalne.

Informacje dotyczące wpływu toksyczności substancji na drobnoustroje mogą okazać się użyteczne w celu dokonania interpretacji słabych wyników oraz wyboru właściwych wielkości stężeń.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

C_T = stężenie testowego związku jako węgla organicznego obecnego w lub dodawanego do osadzonego ścieku na początku czasu napowietrzania (mg/litr),

C_t = stężenie rozwiązanego węgla organicznego w supernatanie substancji testowej na końcu czasu napowietrzania (mg/litr),

C_c = stężenie rozwiązanego węgla organicznego w supernatanie w grupie kontrolnej na końcu czasu napowietrzania (mg/litr).

W metodzie tej biodegradacja określana jest jako zanik węgla organicznego. Biodegradację można wyrazić jako:

1. Procent ubytku D_{da} ilości substancji dodawanej codziennie:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad [1]$$

gdzie:

D_{da} = degradacja/dzienna dawka dodana

2. Procent ubytku D_{ssd} ilości substancji obecnej przy rozpoczęciu każdego dnia badania:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

gdzie:

D_{ssd} = degradacja/substancja przy rozpoczęciu każdego dnia;

wskaźniki i oraz (i + 1) odnoszą się do dnia pomiaru.

Zaleca się równanie 2a) w przypadku, gdy ciecz wypływająca ze zbiornika DOC różni się z dnia na dzień, podczas gdy równanie 2b) można zastosować w przypadku, gdy ciecz wypływająca ze zbiornika DOC pozostaje na względnie stałym poziomie w kolejnych dniach.

▼B

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

W niektórych przypadkach podczas badania nowych substancji użyteczne mogą okazać się substancje odniesienia; jednakże nie można zalecić żadnych poszczególnych substancji odniesienia.

Dane dotyczące kilku związków chemicznych przeanalizowanych za pomocą prób pierścieniowych dostarczane są głównie w celu przeprowadzenia (zob. dodatek 1) kalibracji metody odpowiednio do potrzeb i umożliwienia dokonania porównania wyników w przypadku zastosowania innej metody.

1.4. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Aktywowany szlam, pochodzący z oczyszczalni ścieków, umieszczany jest w jednostce działającej na zasadzie szlamu aktywowanego o przepływie półstałym (SCAS). Następnie dodawany jest badany związek oraz wewnętrzne ścieki, po czym następuje napowietrzanie mieszaniny przez 23 godziny. Po 23 godzinach napowietrzanie zostaje przerwane w celu umożliwienia osadzenia się szlamu i ubytku supernatantów.

Następnie szlam pozostały w komorze napowietrzania jest mieszany z dalszą podwielokrotnością badanego związku i ścieku, a cykl jest powtarzany.

Biodegradacja ustalana jest przez określenie zawartości rozwiązanego węgla organicznego w supernatancie. Uzyskana wartość porównywana jest z wartością ustaloną dla płynu otrzymanego z probówki kontrolnej dozowanej jedynie osiadłym ściekiem.

W przypadku użycia szczególnej metody analitycznej można dokonać pomiaru zmian w stężeniu pierwotnej molekuły w wyniku biodegradacji (podstawowa biodegradacja).

1.5. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

Reprodukcyjność metody, oparta na ubytku rozwiązanego węgla organicznego, nie została jeszcze ustalona. (W przypadku rozważania podstawowej biodegadacji bardzo dokładne dane uzyskiwane są w odniesieniu do materiałów degradowanych ekstensywnie).

Czułość metody jest przeważnie ustalana przez zmienność próbki ślepej i, w mniejszym stopniu, przez precyzję określenia rozwiązanego węgla organicznego i poziomu badanego związku w roztworze po rozpoczęciu każdego cyklu.

1.6. OPIS PROCEDURY BADAWCZEJ

1.6.1. *Przygotowania*

Dla każdej substancji testowej oraz grup kontrolnych składana jest odpowiednia liczba czystych napowietrzanych jednostek, ewentualnie można zastosować oryginalne, 1,5-litrowe jednostki badawcze SCAS oraz probówki doprowadzające powietrze (rysunek 1). Sprężone powietrze doprowadzane do jednostek testowych, oczyszczone przez bawełniano-wełniany filtr, nie powinno zawierać węgla organicznego oraz powinno zostać nasycone wodą w celu obniżenia jej ubytku wskutek parowania.

Próbka zmieszanego płynu, zawierająca 1–4 g zawieszonej suchej masy na litr, otrzymywana jest z oczyszczalni ścieków, oczyszczającej w głównej mierze ścieki wewnętrzne. Wymagane jest około 150 ml zmieszanego płynu dla każdej napowietrzanej jednostki.

▼B

Roztwory podstawowe substancji testowej przygotowywane są w wodzie destylowanej; wymagana wartość stężenia zazwyczaj wynosi 400 mg/litr, tak jak węgiel organiczny, którego stężenie substancji testowej wynosi 20 mg/litr węgla na początku każdego cyklu napowietrzania, jeżeli nie zachodzi biodegradacja.

Dopuszczane są wyższe stężenia, jeżeli pozwala na to wpływ toksyczności na drobnoustroje.

Skład węgla organicznego roztworów podstawowych podlega pomiarowi.

1.6.2. *Warunki badania*

Badanie należy przeprowadzić w temperaturze 20–25 °C.

Stosowane jest wysokie stężenie drobnoustrojów tlenowych (1–4 g/litr zawieszonej suchej masy), a skuteczny okres zatrzymania wynosi 36 godzin. Materiał zawierający węgiel w pożywce szlamowej jest rozlegle utleniany, zazwyczaj w ciągu ośmiu godzin od rozpoczęcia każdego cyklu napowietrzania. Od tego czasu szlam oddycha endogenicznie przez pozostały czas napowietrzania, w którym jedyny dostępny substrat stanowi związek testowy, jeżeli również nie ulega łatwej metabolizacji. Cechy te, połączone z codziennym szczepieniem substancją testową, w przypadku zastosowania wewnętrznego ścieku jako pożywki, zapewniają wysoce korzystne warunki zarówno dla aklimatyzacji, jak i dla wysokiego stopnia biodegradacji.

1.6.3. *Przeprowadzenie badania*

Próbka zmieszanego płynu pochodząca z oczyszczalni ścieków, oczyszczającej w głównej mierze ścieki wewnętrzne lub jednostki laboratoryjnej, uzyskiwana jest i utrzymywana w warunkach tlenowych aż do chwili jej użycia w laboratorium. Każda napowietrzana jednostka, a także jednostka kontrolna wypełniana jest 150 ml zmieszanego płynu (w przypadku użycia oryginalnej jednostki testowej SCAS należy pomnożyć dane wielkości przez 10) i rozpoczyna się napowietrzanie. Po 23 godzinach napowietrzanie zostaje przerwane na 45 minut, w celu umożliwienia osadzenia się szlamu. Z kolei należy otworzyć zawór każdego zbiornika i pobrać 100 ml porcję supernatanu. Próbka osiadłego ścieku wewnętrznego powinna zostać pobrana bezpośrednio przed jej użyciem i 100 ml dodawane jest do szlamu pozostającego w każdej napowietrzanej jednostce. Proces napowietrzania rozpoczyna się od nowa. W tej fazie nie są dodawane żadne materiały testowe, a jednostki zasilane są codziennie wyłącznie wewnętrznymi ściekami aż do chwili otrzymania czystego supernatanu po osadzeniu. Powyższa faza zazwyczaj trwa dwa tygodnie, podczas których rozwiązany węgiel organiczny w supernatanie zbliża się do stałej wartości na końcu każdego cyklu napowietrzania.

Po upływie tego okresu poszczególne osadzone szlamy należy zmieszać i dodać 50 ml otrzymanego w ten sposób połączonego szlamu do każdej jednostki.

95 ml osadzonego ścieku i 5 ml wody dodawane jest do jednostek kontrolnych, i 95 ml osadzonego ścieku plus 5 ml właściwego roztworu podstawowego badanego związku (400 mg/litr) dodawane jest do jednostek testowych. Napowietrzanie należy rozpocząć od nowa i kontynuować przez 23 godziny. Następnie należy umożliwić osadzenie się szlamu przez okres 45 minut oraz należy ściągnąć i przeanalizować supernatan w celu ustalenia składu rozwiązanego węgla organicznego.

Powyższą procedurę napełniania i ściągania powtarza się codziennie przez cały okres trwania badania.

▼B

Przed osadzeniem konieczne jest oczyszczenie ścian jednostek w celu zapobieżenia nagromadzania się suchej masy ponad poziom płynu. W tym celu należy użyć oddzielnego skrobaka lub szczotki dla każdej z jednostek, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu.

Najlepiej, aby wartość rozwiązanego węgla organicznego w supernatanie ustalana była codziennie, chociaż dopuszcza się rzadsze przeprowadzanie analiz. Przed przeprowadzeniem analiz płyny filtrowane są przez oczyszczone 0,45 μm filtry membranowe lub odwirowywane. Filtry membranowe są odpowiednie jeżeli zostanie potwierdzone, iż nie uwalniają węgla, ani nie absorbują substancji w fazie filtracji. Temperatura próbki nie może przekraczać 40 ^{o}C w chwili umieszczenia jej w wirówce laboratoryjnej.

Długość trwania badania w odniesieniu do związków wykazujących niską lub zerową biodegradację nie jest określona, ale doświadczenie sugeruje, iż taki okres powinien trwać co najmniej 12 tygodni, ale nie dłużej niż 26 tygodni.

2. **DANE I OSZACOWANIE**

Wartości rozwiązanego węgla organicznego w supernatanach w jednostkach testowych i jednostkach kontrolnych nanoszone są na wykres względem czasu.

W przypadku osiągnięcia biodegradacji jej poziom określony w jednostce badawczej zbliży się do poziomu w jednostce kontrolnej. Po ustaleniu stałej różnicy między dwoma poziomami w trzech kolejnych pomiarach liczba kolejnych pomiarów uzależniona jest od możliwości dokonania statystycznej analizy danych oraz należy obliczyć procentową biodegradację związku testowego (D_{da} lub D_{ssd}, zob. 1.2).

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— wszelkie informacje dotyczące rodzaju ścieku, typu zastosowanej jednostki oraz wyniki badania dotyczące substancji testowej, substancji odniesienia, jeżeli została użyta, oraz próbki ślepej,

— temperatura,

— krzywa ubytku związku wraz z opisem, sposób obliczania (zob. 1.2),

— data i lokalizacja pobrania próbki aktywowanego szlamu i ścieku, poziom przystosowania, stężenie itd.,

— naukowe powody jakichkolwiek zmian procedury badawczej,

— data i podpis.

▼B

3.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Ponieważ substancja przeznaczona do badania niniejszą metodą nie będzie ulegać łatwej biodegradacji, jakikolwiek ubytek DOC spowodowany wyłącznie biodegradacją przebiegać będzie stopniowo w okresie dni i tygodni, z wyjątkiem takich przypadków, gdzie aklimatyzacja jest nagła i zasygnalizowana nagłym zniknięciem substancji następującym po okresie kilku tygodni.

Jednakże fizyko-chemiczna adsorpcja może w niektórych przypadkach odegrać istotną rolę; sygnalizowane jest to w chwili gdy następuje całkowity lub częściowy ubytek dodanego DOC na początku badania. To, co następuje później, zależy od czynników, takich jak stopnie adsorpcji i stężenia zawieszonej suchej masy w odrzuconej cieczy wypływającej ze zbiornika. Zwykle różnica między stężeniami DOC w supernatanach w grupie kontrolnej i w grupie badanej stopniowo wzrasta od początkowej niskiej wartości, a następnie utrzymuje się na nowym poziomie wartości w pozostałym okresie badania, jeżeli nie zachodzi aklimatyzacja.

Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań, jeżeli istnieje potrzeba rozróżnienia między biodegradacją (lub częściową biodegradacją) i adsorpcją. Można to osiągnąć na wiele sposobów, ale najbardziej przekonujące jest użycie supernatantu lub szlamu jako inokulum w teście podstawowym (najlepiej teście respirometrycznym).

Substancje testowe powodujące wysoki, nieadsorpcyjny ubytek DOC w niniejszym badaniu należy uważać za substancje wpływające biodegradacyjnie. Częściowy, nieadsorpcyjny ubytek oznacza, że substancja chemiczna ulega co najmniej nieznacznej biodegradacji.

Niski, lub zerowy poziom ubytku DOC może być spowodowany zahamowaniem aktywności drobnoustrojów przez substancję testową, co można również wykryć przez rozpad lub utratę szlamu, dającego mętne supernatany. Badanie należy powtórzyć, wykorzystując niskie stężenie substancji testowej.

Użycie specyficznej dla danego związku metody analitycznej lub substancji testowej znakowanej izotopem węgla ^{14}C zwiększa czułość metody. W przypadku związków znakowanych ^{14}C odzyskanie $^{14}CO_2$ potwierdzi, że zaszła biodegradacja.

W przypadku podawania wyników z uwzględnieniem początkowej biodegradacji, jeżeli możliwe, należy wyjaśnić zmianę w budowie chemicznej, która powoduje utratę reakcji macierzystej substancji testowej.

Zatwierdzenie metody analitycznej musi być dostarczone razem z reakcją, która zaszła w próbce ślepej.

4. **ODNIESIENIA**

(1) OECD, Paryż, 1981, *Wytyczne badania 209*, decyzja Rady C (81) 30 wersja ostateczna.

▼B

Dodatek 1

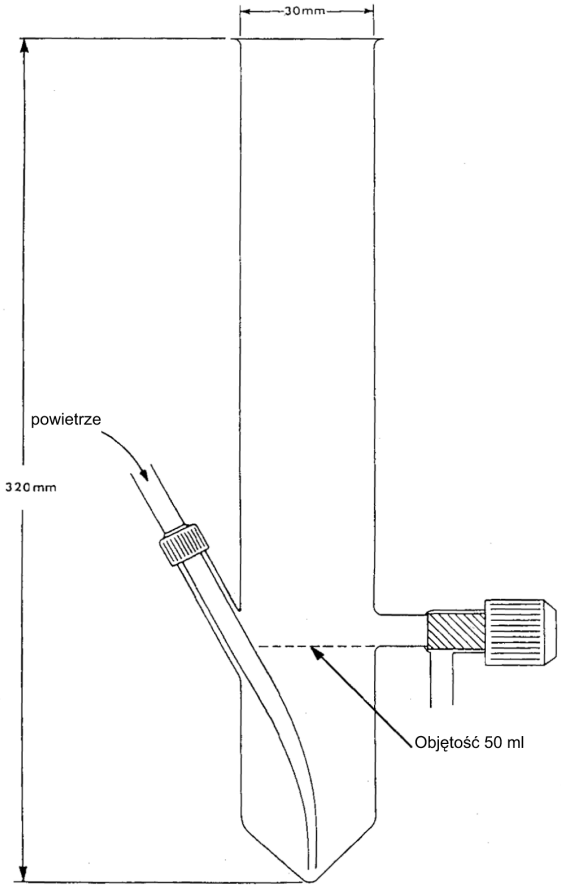
Badanie SCAS: przykładowe wyniki

Substancja	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Procentowa biodegradacja, D_{da}	Czas trwania badania (dni)
Sulfonian 4-acetyloaminobenzenu	17,2	2,0	85	40
Sulfonian tetrapropylenobenzenu	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Glikol dietylenowy	16,5	0,2	98,8	40
Anilina	16,9	1,7	95,9	40
Cyklopentanotetrakarboksylan	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Dodatek 2

Przykładowe urządzenia badawcze



▼M7

C.13. **BIOAKUMULACJA U RYB: NARAŻENIE DROGĄ WODNĄ I POKARMOWĄ**

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 305 (2012). Główny cel przeglądu niniejszej metody badawczej ma dwojaki charakter: Po pierwsze, ma na celu wprowadzenie badania bioakumulacji pokarmowej ([1]) nadającego się do oznaczenia potencjału bioakumulacji substancji o bardzo słabej rozpuszczalności w wodzie. Po drugie, ma na celu opracowanie metody badawczej, dzięki której w stosownych okolicznościach będzie wykorzystywana mniejsza liczba ryb ze względu na dobrostan zwierząt i która będzie bardziej racjonalna pod względem kosztów.

Na przestrzeni lat, które upłynęły od momentu przyjęcia skonsolidowanej metody badawczej C.13 (1), poddano badaniom wiele substancji i zarówno laboratoria, jak i organy regulacyjne zdobyły znaczne doświadczenie w tym zakresie. W związku z tym nabrano przekonania, że można zmniejszyć złożoność badania, jeżeli zostaną spełnione określone kryteria (por. pkt 88), oraz że podejście zintegrowane jest możliwe. Zdobyte doświadczenie pokazuje również, że czynniki biologiczne, takie jak wzrost i zawartość lipidów w rybach, mogą mieć duży wpływ na wyniki i że w związku z tym konieczne może być ich uwzględnienie. Ponadto uznano, że badanie substancji bardzo słabo rozpuszczalnych w wodzie może być niewykonalne z technicznego punktu widzenia. Dodatkowo, w przypadku substancji słabo rozpuszczalnych w wodzie, narażenie za pośrednictwem wody w środowisku wodnym może mieć małe znaczenie w porównaniu z drogą pokarmową. Doprowadziło to do opracowania metody badawczej, zgodnie z którą ryby są narażane za pośrednictwem pokarmu (por. pkt 7–14 oraz 97 i nast.). Walidacja (badanie międzylaboratoryjne) narażenia drogą pokarmową została przeprowadzona w 2010 r. (51).

Najważniejsze zmiany obejmują:

— można uznać badanie tylko jednego badanego stężenia za wystarczające, jeżeli istnieje prawdopodobieństwo, że współczynnik biokoncentracji (BCF) nie zależy od badanego stężenia;

— możliwe jest wdrożenie planu badania obejmującego ograniczone do minimum narażenie drogą wodną ze zmniejszoną liczba punktów pobierania próbek, jeżeli spełnione są określone kryteria;

— należy zmierzyć zawartość lipidów w rybie, aby można było określić BCF, przyjmując za podstawę 5-procentową zawartość tłuszczu;

— większy nacisk na ocenę kinetycznego BCF (jeżeli istnieje taka możliwość) poza oceną BCF w stanie równowagi;

— w przypadku niektórych grup substancji proponowane będzie badanie narażenia drogą pokarmową, jeżeli uważa się takie rozwiązanie za odpowiedniejsze niż badanie narażenia drogą wodną;

— należy dokonać pomiaru masy ryby, aby można było skorygować BCF_k pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu.

Przed rozpoczęciem badań na bioakumulację, należy uzyskać dostęp do następujących informacji o substancji badanej:

a) czułość techniki analitycznej do celów pomiaru stężenia w tkance i w wodzie lub w pokarmie zarówno substancji badanej, jak i możliwych metabolitów (por. pkt 65).

b) rozpuszczalność w wodzie [metoda badawcza A.6; (2)]; w celu uzyskania wiarygodnej wartości ten parametr należy oznaczyć zgodnie z metodą, która jest właściwa dla (szacowanego) zakresu rozpuszczalności. W przypadku substancji hydrofobowych będzie to na ogół metoda wymywania;

([1]) Definicje i jednostki można znaleźć w dodatku 1

▼M7

c) współczynnik podziału n-oktanol/woda, K_{OW} ([1]) [metody badawcze A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; lub inne odpowiednie informacje dotyczące zachowania substancji pod względem podziału (e.g. sorpcja w lipidach, K_{OC}); w celu uzyskania wiarygodnej wartości ten parametr należy oznaczyć zgodnie z metodą, która jest właściwa dla (szacowanego) zakresu K_{OW}. W przypadku substancji hydrofobowych będzie to na ogół metoda powolnego mieszania [metoda badawcza A.23 (6)];

d) stabilność substancji w wodzie (hydroliza [metoda badawcza C.7 (7)];

e) stabilność substancji w pokarmie (w szczególności w przypadku wybrania badania narażenia drogą pokarmową);

f) informacje na temat fototransformacji w związku z warunkami napromieniowania podczas badania (8);

g) napięcie powierzchniowe (tj. w przypadku substancji, których log K_{OW} nie można oznaczyć) metoda badawcza A.5 (9)];

h) Prężność par [metoda badawcza A.4 (10)];

i) w stosownych przypadkach wszelkie informacje na temat biotycznego lub abiotycznego rozpadu w wodzie, takie jak (między innymi) szybka biodegradowalność [metoda badawcza C.4 części II–VII (11), metoda badawcza C.29 (12)];

j) informacja na temat metabolitów: struktura, log K_{OW}, powstawanie i rozkład, w stosownych przypadkach;

k) Stała dysocjacji w środowisku kwaśnym (pK_a) w przypadku substancji, które mogą jonizować. W stosowanych okolicznościach należy skorygować pH wody użytej do badania, aby mieć pewność, że substancja występuje w zjonizowanej postaci w trakcie badania, jeżeli jest to zgodne z wymaganiami gatunku ryb.

Niezależnie od wybranej metody narażenia lub systemu pobierania próbek, niniejsza metoda badawcza obejmuje opis procedury wykorzystywanej do scharakteryzowania potencjału bioakumulacyjnego substancji u ryb. Chociaż zdecydowanie preferowane są systemy badania przepływowego, dopuszczalne są systemy półstatyczne, pod warunkiem że spełnione są kryteria ważności (por. pkt 24 i 113). W przypadku narażenia drogą pokarmową system przepływowy nie jest konieczny do utrzymania stężeń badanej substancji w wodzie, ale przyczyni się do utrzymania odpowiednich stężeń rozpuszczonego tlenu i utrzymania wody w czystości oraz eliminowania np. wpływu produktów wydalania.

Niezależnie od wybranej metody badawczej opis niniejszej metody badawczej zawiera dostatecznie dużo szczegółowych informacji umożliwiających wykonanie badania jednocześnie dając dostatecznie dużo swobody na dostosowanie układu doświadczalnego do warunków poszczególnych laboratoriów i różnych cech charakterystycznych substancji badanych. Badanie narażenia drogą wodną jest najodpowiedniejsze w przypadku substancji organicznych, których wartości log K_{OW} wynoszą 1,5–6,0 (13), ale może też być stosowane w przypadku silnie hydrofobowych substancji (o wartości log K_{OW} > 6,0), jeżeli można wykazać uzyskanie stabilnego stężenia całkowicie rozpuszczonej substancji badanej w wodzie. Jeżeli nie można wykazać uzyskania stabilnego stężenia substancji badanej w wodzie, badanie narażenia drogą wodną nie będzie właściwe, a zatem konieczne będzie wykorzystanie narażenia drogą pokarmową w celu zbadania zawartości substancji w tkankach ryb (chociaż interpretacja i wykorzystanie wyników badania narażenia drogą pokarmową mogą zależeć od ram regulacyjnych). Wstępne szacunkowe wartości współczynnika biokoncentracji (BCF, oznaczanego niekiedy jako K_B) w odniesieniu do substancji organicznych wykazujących wartości log K_{OW} około 9,0 można uzyskać z równania Binteina *et al.* (14). Wstępna szacunkowa wartość współczynnika biokoncentracji dla tak silnie

([1]) Niekiedy używane jest oznaczenie P_{OW}; oznaczany metodą wytrząsania w kolbie w ramach metody badawczej A.8 (4), metodą HPLC w ramach metody badawczej A.24 (5) i metodą powolnego mieszania w ramach metody badawczej A.23 (6). Niekiedy do oznaczania log K_{OW} stosowana jest metoda desorbera kolumnowego. Niewiele badań wykonano z wykorzystaniem tej metody, głównie w odniesieniu do bifenyli chlorowanych i dibnezodioksyn (np. Li i Doucette, 1993) (3). W przypadku substancji, które mogą ulegać rozpadowi na jony log K_{OW} powinien odnosić się do formy zjonizowanej.

▼M7

hydrofobowych substancji może być wyższa niż wartość współczynnika biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{SS}), jakiej można byłoby oczekiwać w przypadku doświadczeń laboratoryjnych, zwłaszcza w przypadku stosowania prostego liniowego modelu do wstępnego oszacowania. Parametry charakteryzujące potencjał bioakumulacyjny obejmują stałą szybkości wchłaniania (k_1), stałe wartości wskaźnika utraty, w tym stałą szybkości wydalania (k_2), współczynnik biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{SS}), kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_K) oraz pokarmowy współczynnik biomagnifikacji (BMF) ([1]).

Znakowane izotopem substancje badane mogą ułatwić analizę wody, paszy i próbek ryb oraz mogą być wykorzystane do ustalenia, czy konieczne będzie zidentyfikowanie i ilościowe oznaczenie metabolitów. Jeżeli mierzony jest ogół pozostałości radioaktywnych (np. przez spalenie lub rozpuszczenie tkanki), wartość BCF lub BMF oparta jest na łącznej ilości substancji macierzystej, wszelkich wychwyconych metabolitach, a także na asymilowanym węglu. Z tego względu wartości BCF lub BMF oparty na łącznej ilości pozostałości radioaktywnych nie może być bezpośrednio porównywalny z BCF lub BMF uzyskiwanych w drodze szczegółowej analizy chemicznej samej tylko substancji macierzystej. Przed analizą w ramach badań substancji znakowanych izotopem w celu oznaczenia BCF lub BMF na podstawie substancji macierzystej można stosować procedury oddzielania, takie jak TLC, HPLC lub GC ([2]). W przypadku zastosowania technik oddzielania należy dokonać identyfikacji i oznaczenia ilościowego substancji macierzystej i odpowiednich metabolitów ([3]) (por. pkt 65), jeżeli podstawą do oznaczenia BCF lub BMF ma być stężenie substancji macierzystej w rybach, a nie łączne znakowane izotopem pozostałości. Istnieje również możliwość połączenia badania metabolizmu ryb lub badania rozkładu substancji *in vivo* z badaniem bioakumulacji na podstawie analizy i identyfikacji pozostałości w tkankach. Możliwość metabolizmu można prognozować za pomocą odpowiednich narzędzi (np. zestawu narzędzi OECD QSAR (15) i zamkniętych programów QSAR).

Decyzja dotycząca tego, czy przeprowadzić badanie narażenia drogą wodną czy pokarmową i w jakiej konfiguracji, powinna opierać się na czynnikach określonych w pkt 3, rozpatrywanych łącznie z odpowiednimi ramami regulacyjnymi. Na przykład w przypadku substancji, które mają wysoką wartość log K_{OW}, ale wykazują pomimo to znaczną rozpuszczalność w wodzie w odniesieniu do czułości dostępnych technik analitycznych, w pierwszej kolejności należy rozważyć badanie narażenia drogą wodną. Istnieje jednak możliwość, że informacje dotyczące rozpuszczalności w wodzie nie są całkowicie pewne w odniesieniu do takich hydrofobowych substancji, więc przed podjęciem decyzji, która metoda badawcza ma być zastosowana, należy zbadać możliwość przygotowania stabilnych mierzalnych stężeń roztworu wodnego (stabilne emulsje są niedozwolone) dających się zastosować w badaniu narażenia drogą wodną (16). Nie można udzielić dokładnych normatywnych wskazówek na temat metody, jaka ma być zastosowana, na podstawie kryteriów rozpuszczalności w wodzie i współczynnika podziału n-oktanol/woda, ponieważ inne czynniki (techniki analityczne, rozkład, adsorpcja itp.) mogą mieć istotny wpływ na zastosowanie którejś z metod ze względów przedstawionych powyżej. Wartość log K_{OW} powyżej 5 i rozpuszczalność w wodzie poniżej ~0,01–0,1 mg/l wyznaczają jednak zbiór substancji, w przypadku których badanie narażenia drogą wodną staje się zbyt trudne.

Należy wziąć pod uwagę inne czynniki, które mogą mieć wpływ na wybór rodzaju badania, w tym adsorpcyjny potencjał substancji w odniesieniu do naczyń badawczych i aparatury laboratoryjnej, jej stabilność w roztworze wodnym w stosunku do stabilności w paszy dla ryb (17) (18) itd.

Informacje na temat tych praktycznych aspektów można uzyskać z innych wykonanych już badań nad środowiskiem wodnym. Dalsze informacje na temat oceny aspektów efektywności badań bioakumulacyjnych można znaleźć w literaturze (np. (19)).

W odniesieniu do substancji, w przypadku których rozpuszczalność lub utrzymanie stężenia roztworu wodnego oraz analiza tych stężeń nie stwarza żadnych przeszkód dla zastosowania metody narażenia drogą wodną, metoda ta jest preferowana celem oznaczenia potencjału biokoncentracji substancji. W każdym przypadku należy sprawdzić, czy stężenia ekspozycyjne używane do narażenia drogą

([1]) Definicje i jednostki można znaleźć w dodatku 1

([2]) TLC: chromatografia cienkowarstwowa; HPLC: wysokosprawna chromatografia cieczowa; GC: chromatografia gazowa.

([3]) W świetle niektórych ram regulacyjnych analiza metabolitów może być obowiązkowa, jeżeli są spełnione określone warunki (por. pkt 65).

▼M7

wodną, które mają być użyte w badaniu, mieszczą się w zakresie rozpuszczalności w wodzie w ośrodkach użytych do badania. W celu utrzymania stabilnego stężenia rozpuszczonej substancji badanej można stosować różne metody, na przykład stosować roztwory podstawowe lub systemy pasywnego dawkowania (np. metodę wymywania), o ile można wykazać, że możliwe jest utrzymanie stałych stężeń oraz że ośrodki użyte do badania nie ulegają zmianom w stosunku do zaleceń określonych w pkt 27.

W przypadku substancji o silnych właściwościach hydrofobowych (log K_{OW} > 5 i rozpuszczalność w wodzie poniżej ~0,01–0,1 mg/l) badanie narażenia drogą wodną stać się zbyt trudne. Przyczyny ograniczeń mogą wynikać stąd, że nie można utrzymać stężenia substancji w wodzie na poziomie, który uznaje się za dostatecznie stały (np. na skutek sorpcji na szkle pojemników służących do badania narażenia lub szybkiego wchłaniania przez ryby), lub stąd, że stężenia substancji w wodzie, które mają być zastosowane w badaniu, są tak niskie, że mieszczą się w tym samym zakresie co granica oznaczalności lub poniżej tej granicy ([1]). W odniesieniu do tych silnie hydrofobowych substancji zaleca się stosowanie badania narażenia drogą pokarmową, pod warunkiem że badanie jest zgodne z odpowiednimi ramami regulacyjnymi i potrzebami w zakresie oceny ryzyka.

W przypadku środków powierzchniowo czynnych należy zastanowić się, czy możliwe jest zbadanie biokoncentracji w środowisku wodnym, biorąc pod uwagę właściwości substancji, ponieważ w przeciwnym razie badanie narażenia droga pokarmową jest prawdopodobnie właściwsze. Środki powierzchniowo czynne to substancje, które obniżają napięcie międzyfazowe na granicy faz dwóch cieczy. Ich amfifilowy charakter (tzn. składają się one jednocześnie z części hydrofilowej i hydrofobowej) sprawia, że gromadzą się na powierzchniach takich jak granica woda–powietrze, woda–pokarm i ścianki szklanych naczyń, co utrudnia oznaczenie ich stężenia w wodzie.

Badanie narażenia drogą pokarmową pozwala ominąć niektóre aspekty narażenia w przypadku złożonych mieszanin zawierających składniki o różnej rozpuszczalności granicznej w wodzie, ponieważ porównywalne narażenie na wszystkie składniki mieszaniny jest bardziej prawdopodobne niż w metodzie narażenia drogą wodną (por. (20)).

Należy jednak zwrócić uwagę, że w podejściu polegającym na podawaniu substancji z pokarmem uzyskuje się pokarmowy współczynnik biomagnifikacji (BMF), nie zaś współczynnik biokoncentracji (BCF) ([2]). Istnieją metody szacowania kinetycznego współczynnika biokoncentracji (BCF_K) na podstawie danych uzyskanych w badaniu narażenia drogą pokarmową (o czym była mowa w dodatku 8), ale należy zachowywać ostrożność przy stosowaniu takich metod. Na ogół założeniem wspomnianych metod jest kinetyka pierwszego rzędu i metody te mają zastosowanie wyłącznie do niektórych grup związków chemicznych. Mało prawdopodobne jest, aby można było zastosować takie metody do środków powierzchniowo czynnych (zob. pkt 12).

Zminimalizowana konfiguracja badania narażenia drogą wodną z mniejszą liczbą punktów pobierania próbek w celu ograniczenia liczby zwierząt lub zasobów (por. pkt 83 i nast.) powinna być stosowana wyłącznie do tych substancji, w przypadku których istnieje powód, aby oczekiwać, że wchłanianie i wydalanie będą przebiegały zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu (tj. na ogół w przypadku substancji organicznych nieulegających dysocjacji jonowej, por. pkt 88).

C.13 – I: **BADANIE BIOKONCENCTRACJI U RYB PRZEZ NARAŻENIE DROGĄ WODNĄ**

ZASADA BADANIA

Badanie składa się z dwóch etapów: fazy narażenia (wchłanianie) i fazy po narażeniu (wydalanie). W fazie wchłaniania grupa ryb należących do tego samego gatunku jest narażona na działanie substancji badanej w jednym stężeniu lub w kilku stężeniach w zależności od właściwości substancji badanej (por. pkt 49). Następnie zostają one przeniesione do ośrodka wolnego od substancji badanej na czas trwania fazy wydalania. Faza wydalania jest zawsze niezbędna, chyba że wchłanianie substancji w fazie wchłaniania było nieznaczne. Stężenie substancji badanej w/na rybach (lub ich określonych tkankach) śledzi się

([1]) Na ogół stężenia mierzone w wodzie w fazie wchłaniania powinny być co najmniej rząd wielkości powyżej granicy oznaczalności, aby można było zmierzyć więcej niż jeden okres półtrwania skażenia organizmu w fazie wydalania.

([2]) Definicje i jednostki można znaleźć w dodatku 1

▼M7

w obu fazach badania. Poza grupą narażoną na działanie substancji przetrzymuje się w identycznych warunkach, z wyjątkiem obecności substancji badanej, grupę kontrolną w celu powiązania ewentualnych niekorzystnych skutków zaobserwowanych w badaniu biokoncentracji z odpowiednią grupą kontrolowaną oraz w celu uzyskania stężeń tła substancji badanej ([1]).

W badaniu narażenia drogą wodną faza wchłaniania trwa zazwyczaj 28 dni. Jej czas trwania można w razie potrzeby wydłużyć (por. pkt 18) lub skrócić, jeżeli zostanie wykazane, że stan równowagi został osiągnięty wcześniej (por. dodatek 1, definicje i jednostki). Prognozowany czas trwania fazy wchłaniania i czas do osiągnięcia stanu równowagi można obliczyć z równań podanych w dodatku 5. Następnie rozpoczyna się okres wydalania, gdy ryby nie są już narażone na działanie substancji badanej, co polega na przeniesieniu ryb do takiego samego ośrodka niezawierającego substancji badanej w czystym naczyniu. W miarę możliwości współczynnik biokoncentracji oblicza się jako wskaźnik stężenia substancji zarówno u ryb (C_f), jak i w wodzie (C_w) w stanie równowagi (BCF_{SS}; zob. dodatek 1, definicja) i jako kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_K; zob. dodatek 1, definicje i jednostki), który szacuje się jako stosunek stałej wartości szybkości wchłaniania (k_1) i wydalania (k_2) przy założeniu kinetyki pierwszego rzędu ([2]).

Jeżeli stan równowagi nie zostanie osiągnięty w ciągu 28 dni, wówczas albo oblicza się BCF metodą modelu kinetycznego (por. pkt 38), albo można przedłużyć fazę wchłaniania. Gdyby w związku z tym faza wchłaniania na potrzeby osiągnięcia stanu równowagi stała się zbyt długa (por. pkt 37 i 38, dodatek 5), ze względów praktycznych preferowana jest metoda kinetyczna. Natomiast w przypadku silnie hydrofobowych substancji należy wziąć pod uwagę przeprowadzenie badania narażenia drogą pokarmową, ([3]) pod warunkiem że badanie takie jest zgodne z odpowiednimi ramami regulacyjnymi.

Stała szybkości wchłaniania, stała szybkości wydalania (utraty) (lub stałe w przypadku bardziej złożonych modeli), współczynnik biokoncentracji (w stanie równowagi lub kinetyczny) oraz, w miarę możliwości, granice ufności każdego z tych parametrów oblicza się w oparciu o model, który najlepiej opisuje mierzone stężenia substancji badanej w rybach i wodzie (por. dodatek 5)

Wzrost masy ciała ryb w toku badania będzie powodował spadek stężenia substancji badanej w rosnących rybach (tzw. rozcieńczenie wynikające ze wzrostu), a zatem kinetyczna wartość BCF będzie niedoszacowana, jeżeli nie zostanie skorygowana pod kątem wzrostu (por. pkt 72 i 73).

Wartość BCF jest oparta na całkowitym stężeniu substancji u ryb (tj. w przeliczeniu na łączną mokrą masę ryb). Jednak do szczególnych celów można wykorzystać określone tkanki lub organy (np. mięśnie, wątroba), jeżeli ryby są wystarczająco duże, lub można podzielić ryby na części jadalne (filet) i niejadalne (wnętrzności). Ponieważ w przypadku wielu substancji organicznych istnieje wyraźna zależność między potencjałem biokoncentracji i hydrofobowością, istnieje również odpowiednia zależność między zawartością lipidów u ryb doświadczalnych i zaobserwowaną biokoncentracją takich substancji. Zatem

([1]) W przypadku większości substancji badanych byłoby najlepiej, gdyby nie zostały wykryte w wodzie próby kontrolnej. Stężenia tła powinny mieć znaczenie wyłącznie w przypadku naturalnie występujących materiałów (np. niektórych metali) i substancji wszechobecnych w środowisku.

([2]) Jeśli model kinetyki pierwszego rzędu wyraźnie nie ma zastosowania, wówczas należy zastosować modele bardziej złożone (zob. odniesienia w dodatku 5) i zasięgnąć rady specjalisty ds. biostatystyki.

([3]) Wchłanianie może być ograniczone na skutek niskich stężeń ekspozycyjnych wynikających ze słabej rozpuszczalności w wodzie w badaniu biokoncentracji, podczas gdy znacznie wyższe stężenia ekspozycyjne można uzyskać w badaniu narażenia drogą pokarmową.

▼M7

w celu ograniczenia wpływu tej przyczyny zmienności na wyniki badania w przypadku substancji o wysokiej lipofilowości (tj. wykazujących logK_{OW} > 3), oprócz biokoncentracji uzyskanej bezpośrednio na podstawie badania biokoncentrację należy wyrażać w znormalizowanej postaci jako odsetek ryb o zawartości lipidów wynoszącej 5 % (na podstawie mokrej masy całego ciała). Jest to niezbędne w celu stworzenia podstawy do porównywania ze sobą wyników uzyskanych w odniesieniu do różnych substancji lub gatunków doświadczalnych. Wartość 5-procentowej zawartości lipidów była powszechnie stosowana ponieważ odpowiada ona średniej zawartości lipidów u ryb powszechnie wykorzystywanych na potrzeby niniejszej metodzie badawczej (21).

INFORMACJE DOTYCZĄCE SUBSTANCJI BADANEJ

Poza właściwościami substancji badanych podanymi we wprowadzeniu (pkt 3) inną wymaganą informacją jest toksyczność dla gatunków ryb, które mają zostać wykorzystane w badaniu, najlepiej asymptotyczne LC_{50} (tj. zależne od czasu) lub toksyczność szacowana na podstawie długoterminowych badań z udziałem ryb (np. metody badawcze C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)).

Dostępna musi być odpowiednia metoda analizy o znanej dokładności, precyzji i czułości na potrzeby oznaczenia ilościowego badanej substancji w roztworach do badań i materiale biologicznym wraz ze szczegółami dotyczącymi przygotowania i składowania próbek. Powinna być również znana analityczna granica oznaczalności substancji badanej zarówno w wodzie, jak i w tkankach ryb. W przypadku zastosowania substancji badanej znakowanej izotopem powinna ona mieć jak najwyższą czystość (np. najlepiej 98 %) i powinna być znana procentowa wartość radioaktywności wynikającej z zanieczyszczeń.

WAŻNOŚĆ BADANIA

Aby badanie było ważne, spełnione muszą być następujące warunki:

zmiany temperatury wody nie mogą przekraczać ± 2 °C, ponieważ duże odchylenia mogą wpłynąć na parametry biologiczne istotne dla wchłaniania i wydalania, a także powodować stres u zwierząt;

stężenie rozpuszczonego tlenu nie może spaść poniżej 60 % nasycenia;

stężenie substancji badanej w komorach utrzymuje się w przedziale ± 20 % średniej zmierzonych wartości w trakcie fazy wchłaniania;

stężenie substancji badanej powinno być mniejsze niż jej graniczna rozpuszczalność w wodzie, biorąc pod uwagę wpływ, jaki może mieć woda użyta do badania na efektywną rozpuszczalność ([1]);

upadkowość lub inne niekorzystne skutki / choroby, zarówno wśród ryb w próbie kontrolnej, jak i wśród badanych ryb, jest mniejsza niż 10 % po zakończeniu badania; w przypadku gdy badanie trwa kilka tygodni lub miesięcy, upadkowość lub inne niekorzystne skutki w obydwu grupach ryb powinny być niższe niż 5 % na miesiąc i nie powinny przekraczać 30 % przez cały okres. Znaczne różnice w średnim wzroście między grupą badaną a grupą kontrolną ryb, od których pobierano próbki, mogą wskazywać na wystąpienie efektu toksycznego substancji badanej.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

W razie potrzeby do sprawdzenia procedury doświadczalne przydatne byłoby zastosowanie substancji odniesienia o znanym potencjale biokoncentracji i słabo metabolizowane (np. w przypadku gdy laboratorium nie miało wcześniej do czynienia z badaniem lub zmianie uległy warunki doświadczalne).

([1]) W przypadku substancji wieloskładnikowych, UVCB i mieszanin należy wziąć pod uwagę rozpuszczalność w wodzie każdego istotnego składnika w celu oznaczenia odpowiednich stężeń ekspozycyjnych.

▼M7

OPIS METODY

Aparatura

Należy unikać wykorzystywania materiałów – przy czym dotyczy to wszystkich części sprzętu – które mogą ulegać rozpuszczeniu, sorpcji lub ługowaniu i wywoływać niekorzystne skutki u ryb. Można stosować standardowe, prostokątne lub cylindryczne zbiorniki, wykonane z materiałów chemicznie obojętnych i o odpowiedniej pojemności zgodnie ze wskaźnikiem obciążenia (por. pkt 43). Należy maksymalnie ograniczyć stosowanie przewodów rurowych z miękkich tworzyw sztucznych. Należy stosować przewody rurowe wykonane z politetrfluoroetylenu, stali nierdzewnej lub szkła. Doświadczenie pokazało, że w przypadku substancji badanych o wysokich współczynnikach adsorpcji, np. syntetycznych pyretroidów, może być wymagane stosowanie szkła silanizowanego. W takich sytuacjach sprzęt będzie musi zostać wyrzucony po wykorzystaniu. Przed wprowadzeniem organizmów doświadczalnych zaleca się poddanie układów badawczych działaniu substancji badanej w stężeniach, które mają być zastosowane w badaniu, przez okres konieczny do wykazania utrzymania stabilnych stężeń ekspozycyjnych.

Woda

Zwykle do badania wykorzystywana jest woda naturalna, która należy pozyskać z niezanieczyszczonego źródła o jednolitej jakości. Mimo to lepiej może nadawać się woda regenerowana (tj. woda demineralizowana z dodatkiem znanych ilości określonych składników odżywczych), która gwarantuje niezmienną w czasie jednolitą jakość. Jakość wody rozcieńczającej, która ma być wymieszana z substancją badaną, przed wprowadzeniem do naczynia badawczego (por. pkt 30), powinna umożliwiać przetrwanie wybranego gatunku ryb przez okres aklimatyzacji i badań bez występowania u nich oznak nieprawidłowego wyglądu lub zachowania. W idealnym przypadku należy wykazać, że gatunek doświadczalny może przeżyć, rosnąć i rozmnażać się w wodzie rozcieńczającej (np. w badaniu laboratoryjnym lub badaniu na toksyczność w cyklu życia). Wodę rozcieńczającą należy scharakteryzować, podając co najmniej pH, twardość, całkowitą zawartość substancji stałych, całkowity węgiel organiczny (TOC ([1])) oraz w miarę możliwości również zawartość amonu, azotynu oraz zasadowość, a w odniesieniu do gatunków morskich – zasolenie. Parametry, które są ważne dla optymalnego dobrostanu ryb, nie są w pełni znane, ale w dodatku 2 podano zalecane najwyższe stężenia szeregu parametrów w odniesieniu do wody słodkiej i morskiej użytej do badania.

W czasie trwania badania jakość wody rozcieńczającej powinna być stała. Na początku badania pH wody powinno mieścić się w zakresie 6,0–8,5, lecz w trakcie danego badania powinno mieścić się granicach ± 0,5 jednostek pH. Aby mieć pewność, że woda rozcieńczająca nie będzie wpływała zbytnio na wyniki badania (np. na skutek kompleksowania substancji badanej) lub nie będzie wywierać szkodliwego wpływu na parametry ryb, należy co pewien czas pobierać próbki do analizy, a przynajmniej na początku i po zakończeniu badania. Jeżeli wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, należy oznaczać, np. co trzy miesiące, zawartość metali ciężkich (np. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+}, $Mg2^{+}$, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} i SO_4^{2-}), pestycydów (np. całkowitą zawartość pestycydów fosforoorganicznych i chloroorganicznych), całkowity węgiel organiczny i zawiesinę ogólną. Jeśli można wykazać, że jakość wody rozcieńczającej była stała przez co najmniej rok, oznaczeń można dokonywać rzadziej i w większych odstępach czasu (np. co sześć miesięcy).

Naturalna zawartość cząstek oraz całkowity węgiel organiczny w wodzie rozcieńczającej powinny być jak najniższe, aby zapobiec adsorpcji substancji badanej na częściach organicznych, co może zmniejszyć jej biodostępność i prowadzić do

([1]) Całkowity węgiel organiczny obejmuje węgiel organiczny zawarty w cząsteczkach i rozpuszczalny węgiel organiczny (RWO), tj. całkowity węgiel organiczny = węgiel organiczny zawarty w cząsteczkach + RWO.

▼M7

niedoszacowania BCF. W przypadku cząstek stałych najwyższa dopuszczalna wartość wynosi 5 mg/l (sucha masa nieprzechodząca przez filtr o rozmiarze porów 0,45 μm), a w przypadku całkowitego węgla organicznego – 2 mg/l (por. dodatek 2). W razie potrzeby wodę rozcieńczającą należy przefiltrować przed użyciem. Udział zawartości węgla organicznego w wodzie użytej do badania pochodzącego od ryb doświadczalnych (odchody) oraz z pozostałości pokarmu powinien być jak najniższy (por. pkt 46).

Roztwory do badań

Przygotować roztwór podstawowy substancji badanej w odpowiednim stężeniu. Roztwór podstawowy najlepiej jest przygotowywać mieszając lub wstrząsając substancję badaną z wodą rozcieńczającą. Alternatywnym rozwiązaniem, które w niektórych przypadkach może okazać się odpowiednie, jest zastosowanie systemu dozowania z desorpcją substancji do fazy stałej. Zasadniczo stosowanie rozpuszczalników i środków dyspergujących (środków rozpuszczających) nie jest zalecane (por. (25)); zastosowanie tych materiałów może jednak być dopuszczalne w celu wytworzenia roztworu podstawowego o odpowiednim stężeniu, należy jednak dokładać wszelkich starań, aby ograniczyć stosowanie takich materiałów do minimum i nie wolno przekraczać ich krytycznego stężenia micelizacji (w stosownych przypadkach). Do rozpuszczalników, których można używać, należą: aceton, etanol, metanol, dimetyloformamid i glikol trietylenowy; dopuszczalne środki dyspergujące to Tween 80, metyloceluloza 0,01 % i HCO-40. Stężenie rozpuszczalnika w końcowym ośrodku użytym do badania powinno być jednakowe dla wszystkich podań substancji badanej (tj. bez względu na stężenie substancji badanej) i nie powinno przekraczać oznaczonych dla rozpuszczalnika odpowiednich progowych wartości toksyczności w warunkach badania. Maksymalny poziom odpowiada stężeniu 100 mg/l (lub 0,1 ml/l). Jest mało prawdopodobne, aby stężenie rozpuszczalnika na poziomie 100 mg/l w spowodowało znaczącą zmianę w maksymalnym stężeniu rozpuszczonej substancji badanej, jakie można uzyskać w badanym ośrodku (25). Udział rozpuszczalnika (łącznie z substancją badaną) w całkowitej zawartości węgla organicznego w wodzie użytej do badania powinien być znany. Przez cały okres badania stężenie całkowitego węgla organicznego w naczyniach badawczych nie powinno przekraczać stężenia węgla organicznego pochodzącego z substancji badanej i – jeżeli jest wykorzystywany – rozpuszczalnika lub środka zwiększającego rozpuszczalność ([1]) o więcej niż 10 mg/l (± 20 %). Zawartość części organicznych może mieć znaczący wpływ na ilość wolnej rozpuszczonej substancji badanej w badaniach ryb metodą przepływową, zwłaszcza w przypadku substancji wysoce lipofilowych. Mikroekstrakcja do fazy stałej (por. pkt 60) może stanowić źródło ważnych informacji na temat proporcji związanych i wolnych rozpuszczonych związków, z których te ostatnie z założenia reprezentują część biodostępną. Stężenie substancji badanej nie powinno przekraczać granicy rozpuszczalności substancji badanej w ośrodkach użytych do badania nawet w przypadku użycia rozpuszczalnika lub środka zwiększającego rozpuszczalność. Wykorzystując łatwo biodegradowalne rozpuszczalniki, należy zachować ostrożność, ponieważ mogą one powodować problemy ze wzrostem bakterii w badaniach przepływowych. Jeżeli przygotowanie roztworu podstawowego bez użycia środka zwiększającego rozpuszczalność jest niemożliwe, należy zastanowić się nad stosownością badania narażenia drogą wodną w odróżnieniu od badania narażenia drogą pokarmową.

W przypadku badań przepływowych wymagany jest system, który nieprzerwanie dozuje i rozcieńcza roztwór podstawowy substancji badanej (np. pompa dozująca, rozcieńczalnik proporcjonalny, sytnik), lub system dozowania z desorpcją do fazy stałej w celu doprowadzenia badanych stężeń do komór badawczych. Najlepiej jest umożliwić co najmniej pięć wymian objętości na dobę w każdej komorze badawczej. Preferowana ma być technika przepływowa, ale w przypadkach gdy jej zastosowanie nie jest możliwe (np. gdy wywiera niekorzystny wpływ na organizmy doświadczalne), można stosować technikę półstatyczną, pod warunkiem że spełnione są kryteria ważności (por. pkt 24). Natężenia przepływu roztworów podstawowych i wody rozcieńczającej powinny być sprawdzane przez 48 na godzin przed badaniem, a potem co najmniej raz dziennie w trakcie badania. Kontrola ta obejmuje określenie natężenia przepływu przez każdą komorę badawczą i pozwala zapewnić, aby różniło się ono w obrębie komór albo pomiędzy nimi o więcej niż 20 %.

([1]) Chociaż na ogół nie jest to zalecane, jeżeli stosuje się rozpuszczalnik lub środek zwiększający rozpuszczalność, węgiel organiczny pochodzący z tego środka należy dodać do węgla organicznego pochodzącego z substancji badanej, aby ocenić stężenie węgla organicznego w naczyniach badawczych.

▼M7

Wybór gatunku

Przy wyborze gatunku ważnymi kryteriami są: łatwa dostępność gatunku, możliwość pozyskania w odpowiednich rozmiarach i łatwe utrzymywanie w warunkach laboratoryjnych. Innymi kryteriami wyboru gatunku ryb są jego znaczenie rekreacyjne, komercyjne i ekologiczne oraz porównywalna czułość, wcześniejsze skuteczne zastosowywanie itp. Zalecane gatunki doświadczalne są wymienione w dodatku 3. Mogą być też wykorzystywane inne gatunki, ale może to wiązać się koniecznością dostosowania procedury badawczej w celu zapewnienia odpowiednich warunków badania. W takim przypadku należy podać uzasadnienie wyboru gatunku i metody doświadczalnej. Na ogół wykorzystywanie mniejszych gatunków ryb pozwala skrócić czas do osiągnięcia stanu równowagi, ale może być potrzebna większa liczba ryb (próbek) w celu odpowiedniego przeanalizowania zawartości lipidów i stężeń substancji badanej u ryb. Ponadto różnice w tempie oddychania i metabolizmie między młodymi i starszymi osobnikami mogą utrudniać porównanie wyników różnych badań i różnych gatunków doświadczalnych. Należy zauważyć, że w przypadku gatunku ryb badanego w stadium (młodocianym) szybkiego wzrostu, interpretacja danych może stać się skomplikowana.

utrzymywanie ryb (istotne w odniesieniu do narażenia drogą wodną i pokarmową)

Podstawową populację ryb należy aklimatyzować przez co najmniej dwa tygodnie w wodzie (por. pkt 28) w temperaturze badania i podawać przez cały czas wystarczającą ilość paszy (por. pkt 45). Woda i pokarm powinny być tego samego rodzaju, jaki zostanie zastosowany w toku badania.

Po 48-godzinnym okresie adaptacji odnotowuje się upadkowość i zastosowanie mają następujące kryteria:

— upadkowość przekraczająca 10 % populacji w ciągu siedmiu dni: należy odrzucić całą partię;

— upadkowość 5–10 % populacji w ciągu siedmiu dni: aklimatyzacja przez dodatkowe siedem dni – jeżeli upadkowość będzie większa niż 5 % w ciągu tych siedmiu dni, odrzucić całą partię;

— upadkowość poniżej 5 % populacji w ciągu siedmiu dni: dopuścić partię.

U ryb wykorzystanych do badania nie powinny występować widoczne oznaki chorób i anomalie. Wszystkie chore ryby należy odrzucić. Ryby nie powinny być leczone przez dwa tygodnie poprzedzające badanie ani w jego trakcie.

PRZEPROWADZENIE BADANIA

Badanie wstępne

Przeprowadzenie wstępnego doświadczenia może być przydatne w zoptymalizowaniu warunków badania ostatecznego, np. wyboru stężeń substancji badanej, czasu trwania fazy wchłaniania i wydalania, lub w ustaleniu, czy konieczne jest przeprowadzenie pełnego badania. Plan badania wstępnego należy opracować w taki sposób, aby można było uzyskać wymagane informacje. Można rozważyć, czy badanie zminimalizowane wystarczy do uzyskania wartości BCF czy też potrzebne jest pełne badanie (por. pkt 83–95 dotyczące badania zminimalizowanego).

Warunki narażenia na działanie substancji

Czas trwania fazy wchłaniania

Czas trwania fazy wchłaniania można przewidzieć w oparciu o doświadczenie praktyczne (np. z poprzedniego badania lub badania akumulacji strukturalnie powiązanej substancji) lub na podstawie pewnych empirycznych związków, wykorzystując znajomość rozpuszczalności w wodzie albo współczynnika podziału n-oktanol/woda substancji badanej (pod warunkiem że wchłanianie przebiega według zasady kinetyki pierwszego rzędu, por. dodatek 5).

▼M7

Faza wchłaniania powinna trwać 28 dni, chyba że można wykazać, iż stan równowagi został osiągnięty wcześniej (zob. dodatek 1, definicje i jednostki). Stan równowagi zostaje osiągnięty na wykresie stężenia substancji badanej u ryb (C_f) w stosunku do czasu, w momencie gdy krzywa zaczyna biec równolegle do osi czasu, a wyniki trzech kolejnych analiz poziomu C_f przeprowadzonych na próbkach pobranych w co najmniej dwudniowych odstępach będą odbiegały od siebie najwyżej o ± 20 % oraz między pierwszą a ostatnią analizą nie nastąpi istotny wzrost poziomu C_f. W przypadku próbek zbiorczych należy przeprowadzić co najmniej cztery następujące po sobie analizy. W przypadku substancji badanych o wolnym tempie wchłaniania odstępy czasu pomiędzy analizami powinny wynosić odpowiednio siedem dni. Jeżeli stan równowagi nie zostanie osiągnięty w ciągu 28 dni, wówczas albo oblicza się BCF wyłącznie z zastosowaniem podejścia kinetycznego, które nie jest zależne od osiągnięcia stanu równowagi, albo można przedłużyć fazę wchłaniania, wykonując dalsze pomiary aż do osiągnięcia stanu równowagi albo przez 60 dni, w zależności od tego, których z tych okresów jest krótszy. Również stężenie substancji badanej u ryb pod koniec fazy wchłaniania musi być dostatecznie wysokie, aby można było oszacować w wiarygodny sposób k_2 z fazy wydalania.Jeżeli po upływie 28 dni nie występuje widoczne wchłanianie, badanie można wstrzymać.

Czas trwania fazy wydalania

W przypadku substancji zachowujących się zgodnie z zasadą kinetyki pierwszego rzędu zazwyczaj okres równy połowie trwania fazy wchłaniania wystarczy do odpowiedniego (np. 95-procentowego) obniżenia poziomu skażenia organizmu substancją (wyjaśnienie oszacowania można znaleźć w dodatku 5). Jeżeli czas wymagany do osiągnięcia utraty na poziomie 95 % jest zbyt długi z praktycznego punktu widzenia i przekracza przykładowo dwukrotnie normalny czas trwania fazy wchłaniania (tj. więcej niż 56 dni), można zastosować krótszy okres (np. trwający do momentu, w którym stężenie substancji badanej będzie niższe niż 10-procentowe stężenie w stanie równowagi). Jednak w odniesieniu do substancji, w przypadku których wzorce wchłaniania i wydalania są bardziej złożone niż ma to miejsce w jednokomorowym modelu badania ryb, które odpowiada kinetyce pierwszego rzędu, może być niezbędna dłuższa faza wydalania. Jeżeli obserwowane lub prognozowane są także złożone schematy, zaleca się zasięgnięcie rady specjalisty ds. biostatystyki lub farmakokinetyki w celu prawidłowego skonfigurowania badania. Z chwilą wydłużenia okresu wydalania liczba ryb do pobierania próbek może zacząć stwarzać ograniczenia, a różnice wzrostu między poszczególnymi rybami mogą wpłynąć na wyniki. Okres ten będzie również jednak uwarunkowany okresem, w trakcie którego stężenie substancji badanej w rybach pozostaje na poziomie powyżej analitycznej granicy oznaczalności.

Liczba ryb doświadczalnych

Wybrać taką liczbę ryb przypadającą na każde badanie stężenia, aby w każdym punkcie pobierania próbek dostępne były co najmniej cztery ryby. Ryby powinno się łączyć się tylko wówczas, gdy nie można wykonać analizy analiza pojedynczego osobnika. Jeżeli w zamierzeniu krzywa (i parametry pochodne) ma być dokładniej dopasowana lub wymagane są badania metabolizmu (np. w celu odróżnienia metabolitów od substancji macierzystej w przypadku zastosowania substancji badanych znakowanych izotopem), niezbędna będzie większa liczba ryb w każdym punkcie pobierania próbek. Zawartość lipidów powinna być oznaczana w takim samym materiale biologicznym, jaki jest wykorzystywany dla określania stężenia substancji badanej. W przypadku gdyby okazało się to niemożliwe, mogą być potrzebne dodatkowe ryby (por. pkt 56 i 57).

Jeżeli wykorzystuje się dorosłe ryby (tj. dojrzałe płciowo), nie mogą one być stanie reprodukcyjnym lub bezpośrednio po tarle (tj. już po złożeniu ikry) ani przed badaniem, ani w jego trakcie. Należy również zgłosić, czy samiec lub samica, lub osobniki obu płci są wykorzystywane w doświadczeniu. W przypadku wykorzystania osobników obu płci przed rozpoczęciem narażania należy udokumentować, że różnice w wielkości i zawartości lipidów są nieistotne, w szczególności jeżeli przewiduje się, że niezbędne będzie łączenie samców i samic, aby zapewnić uzyskanie oznaczalnych stężeń substancji lub oznaczalnej zawartości lipidów.

▼M7

W każdym badaniu wybiera się ryby o podobnej masie, tak aby masa najmniejszych nie była mniejsza niż dwie trzecie masy największych. Wszystkie ryby powinny należeć do tej samej klasy wiekowej i pochodzić z tego samego źródła. Ponieważ masa i wiek ryby mogą mieć istotny wpływ na wartości BCF (12), te szczegółowe informacje należy precyzyjnie odnotować. Zaleca się zważenie podpróbki ryb bezpośrednio przed rozpoczęciem badania w celu oszacowania średniej masy (por. pkt 61).

Obciążenie

Należy stosować wysokie odsetki objętości wody do masy ryb, aby ograniczyć do minimum spadek stężenia badanego związku chemicznego w wodzie na skutek dodania ryb na początku badania, a także aby uniknąć obniżenia stężenia rozpuszczonego tlenu. Ważne jest, aby wskaźnik obciążenia był odpowiedni dla zastosowanych gatunków doświadczalnych. W każdym przypadku zaleca się, aby wskaźnik obciążenia pod względem masy ryb do objętości wody wynosił zwykle 0,1–1,0 g ryb (mokra masa) na litr wody na dobę. Zastosowanie wyższych wskaźników obciążenia pod względem masy ryb do objętości wody jest możliwe, jeżeli zostanie wykazane, że wymagane stężenie substancji badanej można utrzymać w granicach ± 20 % oraz że stężenie rozpuszczonego tlenu nie spada poniżej 60 % nasycenia (por. pkt 24).

Wybierając odpowiednie systemy obciążenia, należy brać pod uwagę normalne siedlisko danego gatunku ryb. Na przykład w porównaniu z rybami pelagicznymi ryby denne mogą wymagać większej powierzchni dna akwarium przy tej samej objętości wody.

Karmienie

W okresach aklimatyzacji i badania należy podawać rybom odpowiedni pokarm o znanej zawartości lipidów i całkowitej zawartości białek ilości wystarczającej do utrzymania ich w dobrym stanie i zachowania masy ciała (dopuszczalny jest pewien wzrost masy ciała). Pokarm należy podawać codziennie przez cały okres aklimatyzacji i badania w ustalonej ilości w zależności od gatunku użytego do badania, warunków doświadczalnych i wartości kalorycznej pokarmu (na przykład w przypadku pstrąga tęczowego w przybliżeniu 1–2 % masy ciała dziennie). Częstotliwość karmienia powinna zostać dobrana w taki sposób, aby nie dopuścić do szybkiego wzrostu i dużego zwiększenia zawartości lipidów. W celu utrzymania takiej samej częstotliwości karmienia ilość pokarmu należy odpowiednio przeliczać – na przykład raz w tygodniu. Do celów takiego przeliczenia masę ciała ryb w każdej komorze badawczej można oszacować na postawie masy ciała próbki ryb ostatnio pobranej z tej komory. Nie należy ważyć ryb pozostających w komorze.

Pasza, która nie została spożyta, oraz ekskrementy są wybierane metodą syfonowania z komór badawczych bezpośrednio po karmieniu (od 30 minut do 1 godziny). Komory należy utrzymywać w maksymalnej czystości przez okres trwania badania, aby stężenie części organicznych pozostawało na jak najniższym poziomie (por. pkt 29), ponieważ obecność węgla organicznego może ograniczać biodostępność substancji badanej (12).

Ponieważ wiele rodzajów pokarmów wytwarzane jest na bazie mączki rybnej, należy upewnić się, czy pokarm nie będzie miał wpływu na wyniki badania lub nie będzie powodował niekorzystnych skutków, np. na skutek zawartości (śladowych ilości) pestycydów, metali ciężkich lub samej substancji badanej.

Światło i temperatura

Zaleca się fotoperiod wynoszący 12–16 godzin i dostosowanie temperatury (± 2 °C) do wymagań gatunku doświadczalnego (por. dodatek 3). Rodzaj oraz właściwości oświetlenia powinny być znane. Należy zwrócić uwagę na ewentualną fototransformacje substancji badanej w wyniku napromieniowania w warunkach badania. Należy stosować odpowiednie oświetlenie, unikając narażania ryb na działanie nienaturalnych fotoproduktów. W niektórych przypadkach właściwe może być zastosowanie filtra w celu odfiltrowania promieniowania UV poniżej 290 nm.

▼M7

Badane stężenia

Badanie zostało pierwotnie zaprojektowane pod kątem niepolarnych substancji organicznych W przypadku substancji tego rodzaju można oczekiwać, że narażenie ryb na pojedyncze stężenie jest wystarczające, ponieważ nie są przewidywane żadne skutki stężenia, chociaż w świetle odnośnych ram regulacyjnych mogą być wymagane dwa stężenia. W przypadku badania substancji nienależących do tej grupy lub jeżeli znane są inne wskazania ewentualnej zależności od stężeń, należy wykonać badanie z wykorzystaniem dwóch lub większej liczby stężeń. W przypadku badania tylko jednego stężenia należy przedstawić uzasadnienie dla zastosowania jednego stężenia (por. pkt 79). Również badane stężenie powinno być, na ile to możliwe w praktyce lub z technicznego punktu widzenia, jak najniższe (tj. niezbliżone do granicy rozpuszczalności).

W niektórych przypadkach można przewidzieć, że biokoncentracja substancji zależy od stężenia w wodzie (np. w przypadku metali, których wchłanianie przez ryby może być co najmniej częściowo regulowane). W takich przypadkach niezbędne jest zbadanie co najmniej dwóch, a najlepiej większej liczby stężeń (por. pkt 49), które są istotne dla środowiska. Również w przypadku substancji, których badane stężenia muszą być zbliżone do granicy rozpuszczalności ze względów praktycznych, zaleca się zbadanie co najmniej dwóch stężeń, ponieważ może to umożliwić uzyskanie wiedzy na temat wiarygodności stężeń ekspozycyjnych. Wybór badanych stężeń powinien obejmować stężenie, które ma realne szanse wystąpienia w środowisku oraz stężenie, które jest istotne dla celu konkretnej oceny.

Stężenia substancji badanej powinny być dobierane w taki sposób, aby nie przekraczały poziomu powodującego długoterminowy wpływ lub 1 % stężenia powodującego asymptotyczne LC_{50}, mieściły się w zakresie realnego występowania w środowisku i były co najmniej jeden rząd wielkości powyżej granicy oznaczalności w wodzie w przypadku zastosowanej metody analitycznej. Najwyższe dopuszczalne badane stężenie można również ustalić, dzieląc 96-godzinne LC_{50} przez odpowiedni stosunek stężenia powodującego ostry stan do stężenia powodującego przewlekły stan (np. odpowiednie wartości tego stosunku w przypadku niektórych substancji wynoszą około trzech, ale w kilku przypadkach przekraczają 100). W przypadku zastosowania drugiego stężenia powinno ono różnić się od podanego powyżej dziesięciokrotnie. Jeżeli nie jest to możliwe ze względu na kryterium toksyczności (które wyznacza górną granicę badanego stężenia) i granicę analityczną (która wyznacza dolną granicę badanego stężenia), można zastosować współczynnik niższy niż dziesięć i wziąć pod uwagę użycie substancji badanej (najwyższej czystości, np. najlepiej > 98 %) znakowanej izotopem. Należy zadbać, aby żadne zastosowane stężenie nie przekraczało granicy rozpuszczalności substancji badanej w ośrodku użytym do badania.

Kontrole

Do serii badań dodatkowo musi być włączona jedna próba kontrolna z wodą rozcieńczającą (por. pkt 30 i 31) lub, w stosownych przypadkach, jedna próba kontrolna z rozpuszczalnikiem.

Częstotliwość pomiarów jakości wody

W trakcie badania należy dokonywać pomiarów rozpuszczonego tlenu, całkowitego węgla organicznego, pH i temperatury we wszystkich naczyniach do badania i naczyniach z próbami kontrolnymi. W próbach kontrolnych i w jednym naczyniu należy oznaczyć całkowitą twardość i zasadowość (w stosownych przypadkach). W przypadku badanie dwóch lub większej liczby stężeń te parametry należy oznaczać przy wysokim (lub najwyższym stężeniu). Poziom rozpuszczonego tlenu oraz zasolenie (w stosownych przypadkach) należy oznaczać co najmniej trzykrotnie – na początku, mniej więcej w połowie i pod koniec fazy wchłaniania – oraz raz w tygodniu w fazie wydalania. Całkowity węgiel organiczny należy oznaczyć na początku badania (24 godziny i 48 godzin przed rozpoczęciem fazy wchłaniania), przed wpuszczeniem ryb oraz co najmniej raz w tygodniu w fazie wchłaniania i wydalania. Temperatura powinna być mierzona codziennie, pH na początku i na końcu każdego okresu, a twardość – raz w ciągu każdego badania. Zaleca się ciągłe monitorowanie temperatury co najmniej w jednym pojemniku.

▼M7

Pobieranie próbek oraz analiza ryb i wody

harmonogram pobierania próbek ryb i wody

Należy pobrać próbkę wody z komór badawczych do oznaczania stężenia substancji badanej przed wpuszczeniem ryb i w trakcie faz wchłaniania i wydalania. Próbkę wody należy pobrać przed podaniem pokarmu jednocześnie z pobraniem próbki ryb. Przydatna może być większa częstotliwość pobierania próbek w celu upewnienia się co do stabilności stężenia po wpuszczeniu ryb. W fazie wchłaniania należy oznaczać stężenia substancji badanej w celu sprawdzenia zgodności z kryteriami ważności (pkt 24). Jeżeli analiza próbki wody na początku fazy wydalania wskazuje, że substancja badana nie została wykryta, można ten wynik wykorzystać jako uzasadnienie dla rezygnacji z pomiarów pod kątem substancji badanej w wodzie użytej do badania i w wodzie próby kontrolnej przez pozostałą część okresu wydalania.

Próbki ryb na potrzeby badania na obecność substancji badanej należy pobrać co najmniej pięciokrotnie w fazie wchłaniania i co najmniej czterokrotnie w fazie wydalania. Ponieważ czasami trudno będzie obliczyć dostatecznie dokładne szacunkowe wartość BCF w oparciu o tę liczbę próbek (zwłaszcza jeśli wskazane są rodzaje kinetyki inne niż prosta kinetyka wchłaniania i wydalania pierwszego rzędu), zalecane byłoby pobieranie próbek w obu fazach z większą częstotliwością (por. dodatek 4).

Zawartość lipidów należy oznaczać co najmniej na początku i na końcu fazy wchłaniania oraz na końcu fazy wydalania w takim samym materiale biologicznym, jaki jest wykorzystywany dla określania stężenia substancji badanej. W przypadku gdyby okazało się to niemożliwe, należy pobrać trzy oddzielne próbki ryb w celu oznaczenia zawartości lipidów w każdym z tych samych trzech punktów czasowych. Stosownie do okoliczności należy skorygować liczbę ryb w zbiorniku na początku doświadczenia ([1]). Natomiast w przypadku gdy nie zostaną wykryte istotne ilości substancji badanej w rybach kontrolnych (tj. rybach z populacji podstawowej), ryby kontrolne z badania można poddać analizie tylko na zawartość lipidów i analizę substancji badanej w grupach badanych (oraz powiązaną stałą szybkości wchłaniania, stałą szybkości wydalania i wartości BCF) można korygować pod kątem zmian w trakcie badania zgodnie z zawartością lipidów w grupie kontrolnej ([2]).

Martwe lub śnięte ryby nie powinny być analizowane pod kątem substancji badanej lub stężenia lipidów.

Przykład dopuszczalnego harmonogramu pobierania próbek jest podany w dodatku 4. Inne plany można łatwo utworzyć na podstawie obliczeń z wykorzystaniem innych wartości K_{OW} przyjmowanych do obliczenia czasu narażenia dla wchłaniania 95 % (obliczenia można znaleźć w dodatku 5).

Pobieranie próbek należy kontynuować w fazie wchłaniania do momentu uzyskania stanu równowagi (zob dodatek 1, definicje i jednostki) lub w przeciwnym razie faza wchłaniania zostaje zakończona (po upływie 28 lub 60 dni, por. pkt 37 i 38). Przed rozpoczęciem fazy wydalania ryby należy przenieść do czystych naczyń.

Pobieranie i przygotowywanie próbek

Próbki wody do analizy należy pobierać na przykład metodą syfonowania przez przewód rurowy z obojętnego chemicznie materiału w centralnym punkcie komory badawczej. Nie zawsze można oddzielić część substancji badanej, która nie jest biodostępna, od części biodostępnej w drodze filtrowania albo odwirowywania. W razie trudności z biodostępnością w przypadku danej techniki oddzielania należy zawsze podać w sprawozdaniu z badania uzasadnienie techniki oddzielania lub jej walidację (25). W szczególności w odniesieniu do substancji hydrofobowych (tj. substancji o log *K*OW > 5) (12) (26), w przypadku których mogłaby występować adsorpcja na materiale filtracyjnym lub w pojemniku wirówki, nie należy poddawać próbek takiej obróbce. Zamiast tego należy

([1]) Jeżeli zawartość lipidów nie jest oznaczana u tych samych ryb co substancja badana, ryby powinny mieć co najmniej podobną masę ciała i być tej samej płci (w stosownych przypadkach).

([2]) To drugie rozwiązanie jest ważne tylko w przypadku gdy ryby we wszystkich grupach badanych są trzymane w grupach osobników o podobnych wymiarach, są usuwane według tego samego wzorca i karmione w taki sam sposób. W ten sposób zapewnia się podobny wzrost ryb we wszystkich grupach badanych, jeżeli badane stężenie jest niższe od zakresu toksyczności. W przypadku podobnego wzrostu masy ciała można oczekiwać, że zawartość lipidów również będzie podobna. Inny wzrost masy ciała w grupie kontrolnej wskazywałby na wpływ substancji i powodowałby nieważności badania.

▼M7

prowadzić pomiary w celu utrzymania zbiorników w jak największej czystości (por. pkt 46) i monitorować całkowity węgiel organiczny w fazach wchłaniania i wydalania (por. pkt 53). W celu uniknięcia ewentualnych problemów z obniżoną biodostępnością można, w przypadku substancji o słabej rozpuszczalności i wysokiej hydrofobowości, zastosować techniki mikroekstrakcji do fazy stałej.

Ryby, z których pobiera się próbki, należy bezzwłocznie uśmiercić, stosując najodpowiedniejszą metodę (w przypadku mierzenia ryby w całości nie należy wykonywać żadnych innych czynności poza opłukaniem w wodzie (por. pkt 28) i osuszeniem na bibule). Należy zważyć ryby i zmierzyć ich długość całkowitą ([1]). Dane dotyczące masy i długości każdej ryby należy powiązać ze stężeniem analizowanej substancji (i w stosownych przypadkach zawartością lipidów), na przykład przy użyciu indywidualnego kodu identyfikacyjnego w odniesieniu każdej ryby z próby.

Preferowane jest wykonanie analizy ryby i wody bezzwłocznie po pobraniu próbek, aby zapobiec degradacji lub innym stratom oraz aby obliczyć średnie stałe szybkości wchłaniania i wydalania w miarę upływu czasu badania. Bezpośrednia analiza pozwala również uniknąć opóźnień w osiągnięciu *plateau* (stanu równowagi).

Jeśli analizy nie wykonuje się bezzwłocznie, próbki należy przechowywać z zastosowaniem odpowiedniej metody. Przed przystąpieniem do badania należ uzyskać informacje na temat właściwej metody przechowywania danej substancji badanej – na przykład stosując głębokie mrożenie, przechowywanie w temperaturze 4 °C, ekstrakcję itd.. Czas przechowywania należy dobrać w taki sposób, aby substancja nie uległa rozkładowi w trakcie przechowywania.

Jakość metody analitycznej

Ze względu na to, że cała procedura jest uzależniona głównie od dokładności, precyzji i czułości metody analitycznej wykorzystywanej w odniesieniu do substancji badanej, należy doświadczalnie sprawdzić, czy dokładność, precyzja oraz odtwarzalność analizy substancji, jak również odzysk substancji badanej zarówno z wody, jak i z ryb są wystarczające w przypadku danej metody. Należy to wykonać w ramach badań wstępnych. Należy również sprawdzić, czy substancja badana nie jest wykrywalna w użytej wodzie rozcieńczającej. W razie potrzeby należy skorygować wartości stężenia substancji badanej w wodzie i rybach uzyskanych w badaniu pod kątem odzysku i wartości tła prób kontrolnych. Przez ten czas z próbkami ryb i wody należy postępować w taki sposób, aby zminimalizować zanieczyszczenie i utratę (np. wynikające z adsorpcji przez urządzenie do pobierania próbek).

Analiza próbek ryb

Jeżeli w badaniu wykorzystywane są substancje znakowane izotopem, można wykonać analizę pod kątem całkowitego znakowania izotopem (np. substancja macierzysta i metabolity) lub można oczyścić próbki, tak aby wykonać analizę substancji macierzystej oddzielnie. Jeżeli BCF ma być oparte na substancji macierzystej, należy scharakteryzować główne metabolity przynajmniej pod koniec fazy wchłaniania (por. pkt 6). Do głównych metabolitów zaliczane są te metabolity. które stanowią ≥ 10 % całkowitych pozostałości w tkance ryb, metabolity, które stanowią ≥ 5 % w dwóch kolejnych punktach pobierania próbek, metabolity, których poziomy wzrastają w trakcie fazy wchłaniania, oraz metabolity, których znane toksyczne działanie budzi niepokój. Jeżeli BCF dla całej ryby pod względem całkowitych pozostałości znakowanych izotopem

([1]) Poza masą ciała należy zarejestrować całkowitą długość, ponieważ porównanie zakresu wzrostu długości, jaki miał miejsce w trakcie badania, stanowi dobry wskaźnik wystąpienia niekorzystnego skutku.

▼M7

jest ≥ 500, zalecane byłoby – a w przypadku niektórych kategorii substancji, takich jak pestycydy, zdecydowanie zalecane – zidentyfikowanie i oznaczenie ilościowe głównych metabolitów. Niektóre organy regulacyjne mogą wymagać ilościowego oznaczenia takich metabolitów. Jeżeli w tkance ryby zidentyfikowano i oznaczono ilościowo produkty rozpadu stanowiące ≥ 10 % całkowitych pozostałości znakowanych izotopem, zaleca się wówczas również identyfikację i oznaczenie ilościowe produktów rozpadu w wodzie użytej do badania. Jeżeli nie jest to wykonalne, należy podać wyjaśnienie w sprawozdaniu.

Stężenie substancji badanej powinno zazwyczaj być oznaczane w odniesieniu do każdej indywidualnie ważonej ryby. Jeśli nie jest to możliwe, można połączyć wszystkie próbki podczas każdego pobierania próbek, ale ogranicza to procedury statystyczne, które mogą mieć zastosowanie do danych, w związku z czym badanie musi obejmować odpowiednią liczbę ryb, aby uwzględnić żądane połączenie, procedurę statystyczną i moc statystyczną. Jako wprowadzenie do odpowiednich procedur łączenia mogą posłużyć pozycje (27) i (28) bibliografii.

Poza BCF uzyskanym bezpośrednio na podstawie badania (por. pkt 21) BCF należy wyrażać w znormalizowanej postaci w stosunku do ryby o zawartości lipidów wynoszącej 5 % (na podstawie mokrej masy), chyba że można przyjąć, że substancja badana nie akumuluje się głównie w lipidach. Jeżeli jest to możliwe, zawartość lipidów należy oznaczać przy każdym pobraniu próbki, najlepiej w tym samym ekstrakcie, którego użyto do analizy badanej substancji chemicznej, ponieważ lipidy często muszą być usuwane z ekstraktu przed jego analizą chromatograficzną. Analiza substancji badanych często jednak wymaga stosowania specjalnych procedur ekstrakcji, które mogą być sprzeczne w metodami badawczymi pod kątem oznaczania lipidów. W takim przypadku (dopóki nie staną się dostępne nieniszczące metody instrumentalne) zaleca się stosowanie innej strategii do oznaczania zawartości lipidów w rybach (por. pkt 56). Do oznaczenia zawartości lipidów należy zastosować odpowiednie metody (20). Można zalecić technikę ekstrakcji chloroformem/metanolem (29) jako standardową (30), ale jako technikę alternatywna zaleca się stosowanie metody Smedesa (31). Ta metoda charakteryzuje się porównywalną skutecznością ekstrakcji, wysoką dokładnością, stosowaniem mniej toksycznych rozpuszczalników organicznych i łatwością wykonania. Można stosować inne metody o dokładności porównywalnej do zalecanych metod, jeżeli zostaną odpowiednio uzasadnione. Ważne jest podanie szczegółowych informacji na temat zastosowanej metody.

Pomiar wzrostu ryb

Na początku badania należy zważyć oddzielnie pięć do dziesięciu ryb z populacji i zmierzyć ich długość. Mogą to być te same ryby, które zostaną użyte do analizy lipidów (por. pkt 56). Przed wykonaniem analizy chemicznej lub analizy lipidów należy zmierzyć masę i długość of ryb użytych do każdego pobrania próbek z grup badanych i kontrolnych. Pomiary tych próbek ryb można wykorzystać do oszacowania masy i długości ryb pozostających w zbiornikach badawczych i kontrolnych (por. pkt 45).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

Należy wykreślić krzywą wchłaniania substancji badanej, nanosząc na wykresie jej stężenia w/na rybach (lub określonych tkankach) w fazie wchłaniania w stosunku do czasu na skali arytmetycznej. Jeśli krzywa osiągnęła *plateau*, tj. stała się w przybliżeniu asymptotyczna do osi czasu, BCF w stanie równowagi (BCF_{SS}) należy obliczyć ze wzoru:

$$\frac{C_f \text{wstanie równowagi(średnie)}}{C_w \text{wstanie równowagi(średnie)}}$$

▼M7

Na zwiększenie się C_f może mieć wpływ wzrost ryb (por. pkt 72 i 73). Na średnie stężenie ekspozycyjne (C_w) ma wpływ zmienność w czasie. Można oczekiwać, średnia ważona stężenia w czasie będzie odpowiedniejsza i precyzyjniejsza do celów badań bioakumulacji, nawet jeżeli zmienność mieści się w odpowiednim zakresie ważności (por. pkt 24). Średnią ważoną w czasie stężenia w wodzie można obliczyć zgodnie z dodatkiem 5 sekcja 1.

Kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_K) należy oznaczyć jako stosunek k_1/k_2, tj. obu kinetycznych stałych szybkości reakcji pierwszego rzędu. Stałe szybkości reakcji k_1 i k_2 oraz BCF_K można uzyskać przez jednoczesne dostosowanie fazy wchłaniania i wydalania. Alternatywnie można oznaczyć k_1 i k_2 sekwencyjnie (zob. opis i porównanie tych metod w dodatku 5). Stała szybkości wydalania (k_2) może wymagać korekty o rozcieńczenie wynikające ze wzrostu (por. pkt 72 i 73). Jeśli krzywa wchłaniania/wydalania zdecydowanie nie jest krzywą pierwszego rzędu, wówczas należy zastosować bardziej złożone modele (zob. bibliografia w dodatku 5) i zasięgnąć rady specjalisty ds. biostatystyki lub farmakokinetyki.

Dane na temat masy/długości ciała ryb

Mokre masy i całkowite długości ciała poszczególnych ryb na każdym etapie pobierania próbek są zestawiane w tabelach oddzielnie dla grup badanych i kontrolnych w fazie wchłaniania (w tym podstawowej populacji w odniesieniu do początku wchłaniania) i w fazie wydalania. Zmierzone masy i długości każdej ryby należy powiązać ze stężeniem analizowanej substancji chemicznej, wykorzystując na przykład w tym celu indywidualny kodu identyfikacyjny w odniesieniu każdej ryby z próby. Masa ciała jest preferowaną miarą wzrostu do celów korygowania kinetycznych wartości BCF o rozcieńczenie wynikające ze wzrostu (zob. metoda stosowana do korygowania danych o rozcieńczenie wynikające ze wzrostu określona w pkt 73 i dodatku 5).

Korekta rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu and normalizacja lipidów

Na skutek wzrostu ryb w fazie wydalania mierzone stężenia substancji chemicznej w rybach mogą ulegać zmniejszeniu, w wyniku czego ogólna stała szybkości wydalania (k_2) będzie większa niż wynikałoby to z samych tylko procesów usuwania (np. oddychania, metabolizmu, wydalania). Należy dokonać korekty kinetycznych współczynników biokoncentracji pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu. Wzrost będzie miał również wpływ na wartość BCF_{SS}, ale nie istnieją żadne uzgodnione procedury w zakresie korekty BCF_{SS} pod kątem wzrostu. W przypadkach znacznego wzrostu należy również wyprowadzić BCF_K skorygowany pod kątem wzrostu (BCF_{Kg}), ponieważ może on być znacznie istotniejszą miarą współczynnika biokoncentracji. Zawartość lipidów w rybach doświadczalnych (ściśle związana z bioakumulacją substancji hydrofobowych) może ulegać w praktyce takim zmianom, że niezbędna jest normalizacja do ustalonej zawartości lipidów w rybie (5 % w/w) w celu przedstawienia współczynników biokoncentracji kinetycznych i w stanie równowagi w znaczący sposób, chyba że można przyjąć, iż substancja badana nie kumuluje się głównie w lipidach (np. niektóre substancje perfluorowane mogą wiązać się z białkami). Równania i przykłady obliczeń można znaleźć w dodatku 5.

W celu skorygowania kinetycznego BCF pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu, należy skorygować stałą szybkości wydalania pod kątem wzrostu. Stałą szybkości skorygowaną pod kątem wzrostu (k_{2g}) oblicza się, odejmując stałą szybkości wzrostu (k_g, uzyskaną na podstawie danych z pomiaru masy ciała), od ogólnej stałej szybkości wydalania (k_2). Następnie oblicza się skorygowany pod kątem wzrostu kinetyczny współczynnik biokoncentracji, dzieląc stałą szybkości wchłaniania (k_1) przez skorygowaną pod kątem wzrostu stałą szybkości wydalania (k_{2g}) (por. dodatek 5). W pewnych przypadkach taka metoda zawodzi. Na przykład w przypadku substancji badanych o bardzo niskiej szybkości wydalania u szybko rosnących ryb wartość wyprowadzonej k_{2g} może

▼M7

być bardzo niska, a tym samym błąd w obu stałych szybkości, na podstawie których wyprowadzono tę wartość, osiąga poziom krytyczny i w niektórych przypadkach szacunkowa wartość *k*g może być wyższa niż k_2. Alternatywne podejście, które pozwala pominąć potrzebę korekty o rozcieńczenie wynikające ze wzrostu, polega na wykorzystaniu danych dotyczących masy substancji badanej przypadającej na wydalanie pojedynczej ryby (na podstawie całej ryby) zamiast normalnych danych dotyczących masy substancji badanej przypadającej na jednostkę masy ryb (stężenie). Można to łatwo osiągnąć, ponieważ zgodnie z tą metodą badawczą badania powinny wiązać zapisane stężenia w tkance z masą ciała poszczególnych ryb. Prostą procedurę umożliwiającą osiągnięcie tego celu przedstawiono w dodatku 5. Należy zwrócić uwagę, że k_2 musi zostać zgłoszone nawet w przypadku stosowanie tej alternatywnej metody.

Należy również zgłosić współczynniki biokoncentracji kinetyczne i w stanie równowagi w odniesieniu do domyślnej zawartości lipidów u ryb wynoszącej 5 % (w/w), chyba że istnieją podstawy, by sądzić, że substancja badana nie gromadzi się głównie w lipidach. Dane dotyczące koncentracji w rybach, czyli BCF, są normalizowane zgodnie ze wskaźnikiem mieszczącym się w granicach od 5 % do rzeczywistej (indywidualnej) średniej zawartości lipidów (w % mokrej masy) (por. dodatek 5).

Jeżeli analizę chemiczną i analizę lipidów wykonywano u tej samej ryby, wówczas należy wykorzystać znormalizowane dane dotyczące lipidów danej ryby do obliczenia BCF znormalizowanego pod kątem lipidów. Ewentualnie, jeżeli wzrost u ryb kontrolnych i u ryb narażonych na działanie substancji jest podobny, do celów korekty lipidów można zastosować tylko zawartość lipidów u ryb kontrolnych (por. pkt 56). Metodę obliczania BCF przy znormalizowanym poziomie lipidów przedstawiono w dodatku 5.

Interpretacja wyników

Wyniki badania należy ostrożnie interpretować, w przypadku gdy mierzone stężenia roztworów do badań występują na poziomach zbliżonych do granicy wykrywalności metody analitycznej.

Aby można było wykluczyć występowanie efektów toksycznych, średni wzrost zarówno w badanej grupie, jak i w grupie kontrolnej nie powinien się zasadniczo znacząco różnić. Należy porównać stałe szybkości wzrostu lub krzywe wzrostu obu grup, stosując stosowną procedurę ([1]).

Jasno określone krzywe wchłaniania i wydalania wskazują na dobrej jakości dane o biokoncentracji. W odniesieniu do stałych szybkości, aby można je było uznać za niezawodne, wynik testu zgodności χ^2 powinien wykazać dobre dopasowanie (tj. mały odsetek błędu pomiaru (32)) w przypadku modelu bioakumulacji, (por. dodatek 5). Jeżeli stosuje się więcej niż jedno badane stężenie, różnica między stałymi wchłaniania/wydalania pomiędzy badanymi stężeniami powinna być mniejsza niż 20 % ([2]). W przeciwnym razie można wskazać zależność od stężenia. Należy odnotować zaobserwowane różnice dotyczące stałych szybkości wchłaniania/wydalania między zastosowanymi badanymi stężeniami oraz podać możliwe wyjaśnienia. Zasadniczo 95-procentowa granica ufności w przypadku BCF dobrze zaplanowanych badań jest bliska ± 20 % otrzymanego BCF.

W przypadku badania co najmniej dwóch stężeń wyniki obydwu lub wszystkich stężeń stosuje się do zbadania spójności wyników i do wykazania czy są one

([1]) Można wykonać test *t*-Studenta na stałych szybkości wzrostu, aby zbadać, czy istnieje różnica w zakresie wzrostu między grupą kontrolną a grupą badaną, lub test *F* w przypadku analizy wariancji. W razie konieczności można zastosować test *F* lub test ilorazu wiarygodności, które będą pomocne przy wyborze odpowiedniego modelu wzrostu (monografia OECD nr 54, (32)).

([2]) Takie wartości procentowe pozwalają na założenie, że metody analityczne są niezawodne, a okres połowicznego zaniku wynosi < 14 dni. Jeżeli metody analityczne są w mniejszym stopniu niezawodne lub okres połowicznego zaniku jest (znacznie) dłuższy, wartości te wzrastają.

▼M7

zależne od stężenia. W przypadku badania tylko jednego stężenia w celu ograniczenia wykorzystania zwierząt lub zasobów, należy przedstawić uzasadnienie dla zastosowania jednego stężenia.

Uzyskany BCF_{SS} jest wątpliwy w przypadku, gdy BCF_K jest znacznie wyższy niż BCF_{SS}, gdyż może to wskazywać, że nie osiągnięto stanu równowagi lub że nie uwzględniono procesów rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu ani procesu utraty. W przypadkach, w których BCF_{SS} jest znacznie wyższy od BCF_K, należy sprawdzić wyprowadzone stałe szybkości wchłaniania i wydalania pod kątem błędów i dokonać ich ponownej oceny. Poprawę szacunków BCF_K można uzyskać dzięki innej procedurze dopasowania (por. dodatek 5).

Sprawozdanie z badania

Poza informacjami na temat substancji badanej, o których mowa w pkt 3, sprawozdanie z badania zawiera następujące informacje:

Substancja badana:

właściwości fizyczne oraz, w odpowiednich przypadkach, właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej takie jak nazwa Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) lub nazwa CAS, numer CAS, identyfikator SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp. (w tym w stosownych przypadkach zawartość węgla organicznego);

— w przypadku substancji wieloskładnikowych i UVCB (substancji chemicznych o nieznanym lub zmiennym składzie, złożonych produktów reakcji lub materiałów biologicznych) w miarę możliwości opis nazwy chemicznej poszczególnych składników oraz, w odniesieniu do każdego z nich, odsetek jaki stanowią w całkowitej masie substancji. Należy przedstawić podsumowanie w jaki sposób metoda analityczna zastosowana w badaniu odzwierciedla pomiar stężenia substancji; należy opisać wszystkie procedury analityczne, w tym dokładność metody, granicę wykrywalności metody i granicę oznaczalności;

— w przypadku substancji znakowanych izotopem dokładne położenie znakowanego atomu (znakowanych atomów) oraz wartość procentową promieniotwórczości związanej z zanieczyszczeniami;

— informacje na temat toksyczności substancji badanej dla ryby (w idealnych warunkach dla gatunku doświadczalnego). Należy zgłosić toksyczność jako ostrą 96 h LC_{50} oraz wartości NOAEC i LOAEC otrzymane w ramach badania toksyczności przewlekłej (tj. badania przeprowadzanego we wczesnym stadium życia lub badania prowadzonego podczas całego cyklu życia, o ile są dostępne).

— warunki składowania badanej substancji chemicznej lub substancji badanej i stabilność badanej substancji chemicznej lub substancji badanej w warunkach składowania, jeżeli przed zastosowaniem podlega składowaniu.

Gatunek doświadczalny:

Nazwa systematyczna, odmiana, źródło, jakakolwiek obróbka wstępna, aklimatyzacja, wiek, płeć (w stosownych przypadkach), zakres rozmiarów (masa i długość) itp.

Warunki badania:

— wykorzystana procedura badawcza (np. przepływowa lub półstatyczna); regularne badanie lub plan zminimalizowany (w tym przesłanki i uzasadnienie);

— rodzaj i właściwości stosowanego oświetlenia i fotoperiodu(-ów);

— plan badania (np. liczba i rozmiar komór badawczych, szybkość wymiany objętości wody, wskaźnik obciążenia, liczba kontrprób, liczba ryb przypadających na kontrpróbę, liczba badanych stężeń, długość faz wchłaniania i wydalania, częstotliwość pobierania próbek ryb i wody);

▼M7

— metoda przygotowania roztworów podstawowych i częstotliwość ich wymiany (w przypadku zastosowania rozpuszczalnika należy podać jego rodzaj i stężenie, a także jego wpływ na zawartość węgla organicznego w wodzie użytej do badania) lub opis alternatywnego systemu dawkowania;

— badane stężenia nominalne, średnie wartości pomiarowych i ich odchylenia standardowe w naczyniach badawczych oraz metoda uzyskania takich wartości i częstotliwość pomiaru;

— źródło wody rozcieńczającej, opis jakiejkolwiek obróbki wstępnej, wyniki przeprowadzenia dowodu na zdolność ryb doświadczalnych do życia w wodzie oraz właściwości wody: pH, twardość, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom chloru resztkowego, (jeśli dokonano pomiaru), całkowity węgiel organiczny, zawiesina, zasolenie ośrodka badawczego (w stosownych przypadkach) oraz wszelkie inne wykonane pomiary;

— jakość wody w naczyniach badawczych, pH, twardość, całkowity węgiel organiczny, temperatura oraz stężenie rozpuszczonego tlenu; stosowane metody i częstotliwość pomiaru;

— szczegółowe informacje dotyczące karmienia, np. rodzaj pokarmu(-ów), jego źródło, skład (w miarę możliwości przynajmniej zawartość lipidów i białka), wybrany wskaźnik żywieniowy, ilość podawanego pokarmu i częstotliwość karmienia);

— informacje dotyczące poddania działaniu substancji chemicznej próbek ryb i wody, w tym szczegółowe informacje dotyczące przygotowania, składowania, ekstrakcji oraz procedur analitycznych (i dokładności) w odniesieniu do substancji badanej i zawartości lipidów;

— metody stosowane do randomizacji podawania substancji chemicznej i przypisywania ryb do naczyń badawczych;

— data wprowadzenia organizmów doświadczalnych do roztworów do badań oraz czas trwania badania;

— opis badania ustalającego zakres oraz wyników, jeżeli są dostępne.

Wyniki:

— wyniki z wszelkich przeprowadzonych badań wstępnych;

— upadkowość ryb kontrolnych oraz ryb w każdej komorze narażenia oraz wszelkie inne zaobserwowane nietypowe zachowania;

— informacje dotyczące jakichkolwiek zaobserwowanych niekorzystnych skutków;

— pełen opis wszystkich stosowanych procedur analizy substancji chemicznej, w tym granice wykrywalności i oznaczenie ilościowe, zmienność i ustanie działania substancji;

— zawartość lipidów u ryb, w tym zastosowane metody, oraz współczynnik normalizacji lipidów (L_n, współczynnik służący wyrażeniu wyniku związanego z zawartością lipidów u ryb wynoszącego 5 %), jeżeli go wyznaczono;

— zestawione dane tabelaryczne dotyczące masy (i długości) ryb powiązane z poszczególnymi stężeniami substancji chemicznej (i w stosownych przypadkach zawartością lipidów), zarówno w odniesieniu do grupy kontrolnej, jak i grupy narażonej na działanie substancji chemicznej (na przykład przy użyciu indywidualnych identyfikatorów w przypadku każdej ryby z próby) oraz obliczenia dotyczące wyprowadzonej(-ych) stałej(-ych) szybkości wzrostu;

▼M7

— zestawione w postaci tabeli dane dotyczące stężenia substancji badanej u ryb (C_f, powiązane z poszczególnymi rybami) i w wodzie (C_w) (w stosownych przypadkach wraz z wartościami średniej dla grupy badanej i grupy kontrolnej, odchyleniem standardowym oraz zakresem) w odniesieniu do wszystkich okresów pobierania próbek (C_f wyrażone w mg/kg mokrej masy całego ciała lub jego określonych tkanek, np. lipidów, oraz C_w wyrażone w mg/l). Wartości C_w w odniesieniu do serii prób kontrolnych (należy zgłosić również tło);

— krzywe (w tym wszystkie zmierzone dane) wskazujące następujące wartości (w stosownych przypadkach stężenia można wyrazić w odniesieniu do całego ciała, a zawartość lipidów znormalizować do 5 % zwierzęcia lub jego określonych tkanek):

  — wzrost, tj. masa ryby w stosunku do czasu lub logarytm naturalny zmienionej masy w stosunku do czasu (w tym wyprowadzona stała szybkości wzrostu k_g);

  — wchłanianie i wydalanie substancji badanej u ryby (na jednym wykresie);

  — czas potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi (jeżeli został osiągnięty);

  — logarytm naturalny zmienionego stężenia w stosunku do czasu wchłaniania (w tym wyznaczona stała szybkości wchłaniania k_1);

  — logarytm naturalny zmienionego stężenia (ln stężenia) w stosunku do czasu wydalania (w tym wyznaczona stała szybkości wydalania k_2); oraz

  — krzywe fazy wchłaniania i fazy wydalania wskazujące zarówno dane, jak i dopasowany model;

— jeżeli kontrola wizualna wykresu wykazuje oczywiste wartości odstające, można zastosować statystycznie ważny test na wartość odstającą w celu usunięcia błędnych punktów danych, a także przedstawić udokumentowane uzasadnienie ich pominięcia;

— współczynnik biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{SS}), jeżeli osiągnięto (prawie) stan równowagi;

— kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_K) i wyznaczone stałe szybkości wchłaniania i wydalaniak_1 oraz k_2, wraz z wariancjami w k_2 (nachylenie i punkt przecięcia), jeżeli zastosowano dopasowanie sekwencyjne;

— granice ufności, odchylenie standardowe (w miarę dostępności) i metody obliczania / analizy danych w odniesieniu do każdego z parametrów dotyczących każdego stężenia stosowanej substancji badanej;

  — wszelkie informacje dotyczące metabolitów substancji badanych znakowanych izotopem i ich nagromadzenia;

  — stała/stałe szybkości wzrostu (w tym 95 % przedziału/przedziałów ufności) i obliczona stała szybkości wydalania skorygowana pod kątem wzrostu ((k_{2g}), okres półtrwania i wartości BCF ((BCF_{Kg});

  — wszystko, co odbiega od normy, jeżeli chodzi o badanie, wszelkie odchylenia od tych procedur oraz wszelkie inne ważne informacje;

  — tabela podsumowująca zawierająca istotne zmierzone i policzone dane, jak przedstawiono poniżej:

▼M7

Stałe szybkości wchłaniania i wydalania oraz współczynniki biokoncentracji (BCF) dotyczące substancji	
k_g (stała szybkości wzrostu; dzień$^{-1}$):	podać wartość (95 % CI) (1)
k_1 (ogólna stała szybkości wchłaniania; l kg^{-1} dzień$^{-1}$):	podać wartość (95 % CI) (1)
k_2 (ogólna stała szybkości wydalania; dzień$^{-1}$):	podać wartość (95 % CI) (1)
k_{2g} (stała szybkości wydalania skorygowana pod kątem wzrostu; dzień$^{-1}$):	podać wartość (95 % CI) (1)
C_f (stężenie substancji chemicznej u ryby w stanie równowagi; mg kg^{-1}):	podać wartość ± SD (2)
C_w (stężenie substancji chemicznej w wodzie; mg l^{-1}):	podać wartość ± SD (2)
L_n (współczynnik normalizacji lipidów):	podać wartość (3)
BCF_{SS} (BCF w stanie równowagi; l kg^{-1})	podać wartość ± SD (2)
BCF_{SSL} (BCF przy znormalizowanym poziomie lipidów w stanie równowagi; l kg^{-1}):	podać wartość (3) ± SD (2)
BCF_K (kinetyczny BCF; l kg^{-1})	podać wartość (95 % CI) (1)
BCF_{Kg} (kinetyczny BCF skorygowany pod kątem wzrostu; l kg^{-1})	podać wartość (95 % CI) (1)
$t_{1/2g}$ (okres półtrwania skorygowany pod kątem wzrostu; dzień):	podać wartość (95 % CI) (1)
BCF_{KL} (kinetyczny BCF przy znormalizowanym poziomie lipidów; l kg^{-1}):	podać wartość
BCF_{KLG} (kinetyczny BCF przy znormalizowanym poziomie lipidów skorygowany pod kątem wzrostu; l kg^{-1}):	podać wartość

(1) CI: przedział ufności (jeżeli można go oszacować)
(2) SD: odchylenie standardowe (jeżeli można je oszacować)

Przy opracowywaniu wstępnej metody badawczej i planu badania należy unikać zgłaszania wyników jako „nie wykryto / oznaczono ilościowo na granicy wykrywalności / oznaczenia ilościowego”, gdyż wyników takich nie można użyć do obliczania stałych szybkości.

C.13 – II: ZMINIMALIZOWANE BADANIE NARAŻENIA DROGĄ WODNĄ U RYB

WPROWADZENIE

Z coraz większego doświadczenia zdobywanego podczas prowadzenia i interpretacji pełnych badań, zarówno przez laboratoria, jak i organy regulacyjne, wynika, że, z pewnymi wyjątkami, kinetykę pierwszego rzędu stosuje się do szacowania stałych szybkości wchłaniania i wydalania. W związku z tym stałe szybkości wchłaniania i wydalania można oszacować przy minimalnej liczbie punktów pobierania próbek i wyprowadzonym kinetycznym BCF.

Wstępnym celem analizowania alternatywnych planów badań BCF było opracowanie okrojonego badania, które miało być stosowane na pośrednim etapie badania w celu obalenia lub potwierdzenia szacunków BCF opierających się na K_{OW} i QSAR, a więc wyeliminowanie konieczności przeprowadzenia pełnego badania w odniesieniu do wielu substancji oraz zminimalizowanie kosztów i wykorzystywania zwierząt poprzez zmniejszenie liczby prób i liczby przeprowadzanych sekwencji analitycznych. Postępując zgodnie z głównym planem

▼M7

wcześniejszej metody badawczej, aby pozwolić na integrację wyników badania z istniejącymi danymi dotyczącymi BCF i aby ułatwić prowadzenie badania i interpretację danych, dążono do zapewnienia dostatecznie dokładnych i precyzyjnych szacunków BCF na potrzeby podejmowania decyzji dotyczących oceny ryzyka. Wiele takich względów ma zastosowanie tak samo jak w przypadku pełnego badania, np. kryteria ważności (por. pkt 24) i zatrzymanie badania, w przypadku gdy zaobserwowano nieznaczne wchłanianie pod koniec fazy wchłaniania (por. pkt 16 i 38).

Substancje kwalifikujące się do planu badania zminimalizowanego powinny należeć do ogólnej dziedziny, dla której opracowano niniejszą metodę badawczą, tj. do niepolarnych substancji organicznych (por. pkt 49). W przypadku jakichkolwiek wskazań, że substancja, która ma stanowić przedmiot badania, może wykazywać inne zachowanie (np. wyraźne odchylenie od kinetyki pierwszego rzędu), do celów regulacyjnych należy przeprowadzić pełne badanie.

Badania zminimalizowanego nie prowadzi się zazwyczaj przez krótszy okres niż standardowe badanie na BCF, wykorzystuje się w nim jednak mniej prób ryb (zob. dodatek 6 w kwestii uzasadnienia). W przypadku substancji, które szybko ulegają wydalaniu, można jednak skrócić okres wydalania, aby uniknąć spadku stężenia u ryby poniżej granicy wykrywalności / oznaczalności ilościowej przed końcem badania. Zminimalizowane badanie narażenia ryb z wykorzystaniem jednego stężenia można stosować w celu określenia potrzeby przeprowadzenia pełnego badania, przy czym jeżeli uzyskane dane zastosowane do obliczenia stałych szybkości i BCF są rzetelne (por. pkt 93), można odstąpić od pełnego badania, pod warunkiem że uzyskany BCF jest daleki od regulacyjnych problematycznych wartości.

W niektórych przypadkach korzystne może być przeprowadzenie planu badania zminimalizowanego z więcej niż jednym badanym stężeniem jako badania wstępnego w celu określenia, czy szacunki BCF w odniesieniu do substancji są zależne od stężenia. Jeżeli wartości szacunkowe BCF z badania zminimalizowanego wykazują zależność od stężenia, konieczne będzie przeprowadzenie pełnego badania. Jeżeli w oparciu o takie badanie zminimalizowane wartości szacunkowe BCF nie są zależne od stężenia, lecz wyników nie uznaje się za ostateczne, wówczas można przeprowadzić ewentualne późniejsze pełne badanie z zastosowaniem jednego stężenia, ograniczając w ten sposób wykorzystanie zwierząt w porównaniu do pełnego badania przy (co najmniej) dwóch stężeniach.

Substancje potencjalnie kwalifikujące się do badania zminimalizowanego powinny:

— z dużym prawdopodobieństwem wykazywać przybliżoną kinetykę pierwszego rzędu w odniesieniu do wchłaniania i wydalania, np. uzyskaną z przekroju z podobnymi substancjami;

— posiadać log K_{OW} < 6, chyba że spodziewa się szybkiego metabolizmu ([1]);

— być w wystarczającym stopniu rozpuszczalne w wodzie w odniesieniu do techniki analitycznej (por. pkt 24);

— umożliwiać jasne oznaczenie ilościowe (tj. stężenia powinny być co najmniej jeden rząd wielkości powyżej granicy oznaczalności) zarówno w przypadku ryb, jak i wody, zaleca się znakowanie markerem promieniotwórczym (por. pkt 23); oraz

— mieć dłuższy okres wydalania niż przewidywany okres półtrwania (por. dodatek 5 w odniesieniu do obliczania) lub okres wydalania powinien być odpowiednio dostosowany (por. pkt 91). Dopuszcza się wyjątek od tej zasady, w przypadku gdy oczekiwany jest szybki metabolizm substancji.

([1]) Badanie zminimalizowane można istotnie stosować w celu wykazania szybkiego metabolizmu, jeżeli wiadomo, że jest on prawdopodobny.

▼M7

HARMONOGRAM POBIERANIA PRÓBEK W BADANIACH PROWADZONYCH ZGODNIE Z PLANEM ZMINIMALIZOWANYM

Pobieranie próbek ryb

Pobieranie próbek ryb ogranicza się do czterech punktów pobierania próbek:

— w środku i na końcu fazy wchłaniania (z których drugi punkt stanowi jednocześnie początek wydalania), np. po 14 i 28 dniach (33);

— w środku fazy wydalania i na zakończenie badania (gdy stężenie substancji wynosi < 10 % maksymalnego stężenia lub co najmniej wyraźnie po jednym okresie półtrwania substancji), np. po 7 i 14 dniach wydalania (33). Jeżeli jest spodziewane szybkie wydalenie lub takie zaobserwowano, konieczne może być skrócenie okresu wydalania w celu uniknięcia spadku stężenia u ryby poniżej granicy oznaczalności;

— pomiar lipidów tak ja w przypadku pełnego badania;

— korekta wzrostu tak ja w przypadku pełnego badania;

— BCF oblicza się jako kinetyczny BCF.

Pobieranie próbek wody

W przypadku planu zminimalizowanego próbki wody pobiera się tak jak w przypadku pełnego badania (por. pkt 54) lub co najmniej pięciokrotnie w równych odstępach w fazie wchłaniania i co tydzień w fazie wydalania.

Modyfikacje planu

Uwzględniając właściwości substancji badanej, ważne prognozy QSAR i szczególny cel badania, można rozważyć pewne zmiany w planie badania:

— jeżeli konieczna jest większa precyzja, można wykorzystać więcej ryb (6 lub 8 zamiast 4) w próbie na koniec fazy wchłaniania;

— włączenie dodatkowej grupy ryb do wykorzystania jeżeli po 14 dniach (lub na koniec przewidzianego końca fazy wydalania) wydalanie nie było wystarczające do odpowiedniego wydalenia (tj. >50 %). Jeżeli przewidziany czas trwania fazy wydalania jest krótszy lub dłuższy niż 14 dni, należy dostosować harmonogram pobierania próbek (tj. jedna grupa ryb na koniec przewidywanego końca etapu wydalania i jedna grupa po upływie połowy tego czasu);

— stosowanie dwóch badanych stężeń w celu zbadania możliwej zależności od stężenia. jeżeli wyniki badania zminimalizowanego przeprowadzonego z dwoma badanymi stężeniami wykazują, że BCF nie zależy od stężenia (tj. różni się o mniej niż 20 %), jedno badane stężenie można uznać za wystarczające w pełnym badaniu, jeżeli się je przeprowadza;

— wydaje się prawdopodobne, że można stosować modele procesów bioakumulacji, takie jak proponowane przez Arnot *et al.* (35), jako wsparcie w planowaniu długości faz wchłaniania i wydalania (zob. również dodatek 5).

Obliczenia

Uzasadnieniem takiego podejścia jest to, że współczynnik biokoncentracji w pełnym badaniu można wyznaczyć albo jako współczynnik biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{SS}), obliczając stosunek stężenia substancji badanej w tkance ryby do stężenia substancji badanej w wodzie, albo obliczając kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_K) jako stosunek stałej szybkości wchłaniania k_1 do stałej szybkości wydalania k_2. BCF_K jest ważny, nawet jeżeli nie osiągnięto stężenia substancji w stanie równowagi w fazie wchłaniania, pod warunkiem że proces wchłaniania i wydalania przebiega według kinetyki pierwszego rzędu. Dwa punkty danych są wymagane jako bezwzględne minimum do

▼M7

oszacowania stałych szybkości wchłaniania i wydalania: jeden pod koniec fazy wchłaniania (tj. na początku fazy wydalania) i jeden pod koniec (lub po upłynięciu znacznej części) fazy wydalania. Zaleca się stosowanie pośredniego punktu pobierania próbek jako sprawdzenie kinetyki wchłaniania i wydalania ([1]). W odniesieniu do obliczeń zob. dodatki 5 i 6.

Interpretacja wyników

Aby ocenić ważność i wartość informacyjną badania, należy zweryfikować, czy okres wydalania przekracza jeden okres półtrwania. Ponadto należy porównać BCF_{Km} (kinetyczny BCF wyznaczony z badania zminimalizowanego) ze zminimalizowaną wartością BCF_{SS} (która stanowi BCF_{SS} obliczony po zakończeniu fazy wchłaniania przy założeniu, że został osiągnięty stan równowagi. Może to stanowić wyłącznie założenie, gdyż liczba punktów pobierania próbek nie jest wystarczająca, aby móc to udowodnić). Jeżeli BCF_{Km} < zminimalizowany BCF_{SS}, preferowaną wartością powinien być zminimalizowany BCF_{SS}. Jeżeli BCF_{Km} wynosi poniżej 70 % zminimalizowanego BCF_{SS} wyniki nie są ważne i należy przeprowadzić pełne badanie.

Jeżeli wartość BCF_{Km} uzyskana w badaniu zminimalizowanym będzie bliska jakiejkolwiek wartości będącej przedmiotem zainteresowania regulacyjnego, należy przeprowadzić pełne badanie. Jeżeli wynik jest daleki od jakiejkolwiek regulacyjnej problematycznej wartości (o wiele wyższy lub niższy), pełne badanie może nie być konieczne lub, jeżeli jest to wymagane w ramach regulacyjnych, można przeprowadzić pełne badanie z jednym stężeniem.

Jeżeli pełne badanie okaże się konieczne po przeprowadzeniu badania zminimalizowanego z jednym stężeniem, można je przeprowadzić przy drugim stężeniu. Jeżeli wyniki są spójne, można odstąpić od przeprowadzania pełnego badania z innym stężeniem, gdyż oczekuje się, że biokoncentracja substancji nie jest zależna od stężenia. Jeżeli badanie zminimalizowane przeprowadzono przy dwóch stężeniach, a wyniki wskazują brak zależności od stężenia, można przeprowadzić pełne badanie z tylko jednym stężeniem (por. pkt 87).

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania w odniesieniu do badania zminimalizowanego powinno obejmować wszystkie informacje wymagane w przypadku pełnego badania (por. pkt 81), poza informacjami, które nie są możliwe do opracowania (tj. krzywą przedstawiającą czas potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi i współczynnikiem biokoncentracji w stanie równowagi; w przypadku drugiej informacji, należy podać zamiast niej zminimalizowany BCF_{ss}). Ponadto powinno ono również zawierać uzasadnienie zastosowania badania zminimalizowanego oraz uzyskany BCF_{Km}.

C.13 – III: **BADANIE BIOAKUMULACJI U RYB PRZEZ NARAŻENIE NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI DROGĄ POKARMOWĄ**

WPROWADZENIE

Metodę opisaną w niniejszej sekcji należy stosować w odniesieniu do substancji, w przypadku których nie jest możliwe zastosowanie metody narażenia drogą wodną (na przykład ze względu na brak możliwości utrzymania stabilnych i mierzalnych stężeń wody lub brak możliwości osiągnięcia odpowiedniego skażenia organizmu w ciągu 60 dni narażenia; zob. poprzednia sekcja dotycząca metody narażenia drogą wodną). Należy jednak zdać sobie sprawę, że punktem końcowym tego badania będzie pokarmowy współczynnik biomagnifikacji (BMF), nie zaś współczynnik biokoncentracji (BCF) ([2]).

W maju 2001 r. na konferencji SETAC Europe w Madrycie przedstawiono nową metodę badania bioakumulacji substancji organicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie (36). Pracę tę oparto na różnych zgłoszonych badaniach zawartych w literaturze dotyczących bioakumulacji, w ramach których stosowano metodę dawkowania przez wzbogaconą paszę (*np.* (37)). Na początku 2004 r. grupie roboczej UE do spraw PBT przedłożono projekt protokołu (38), wraz z uzupełniającym dokumentem bazowym (39), opracowany w celu pomiaru potencjału bioakumulacji substancji organicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie, w odniesieniu do których nie jest możliwe zastosowanie standardowej metody badania

([1]) Jeżeli dokonuje się pomiaru tylko dwóch punktów danych, można oszacować granice ufności w odniesieniu do BCF_{Km}, stosując metody bootstrap. Jeżeli dostępne są również pośrednie punkty danych, granice ufności w odniesieniu do BCF_{Km} można obliczyć w pełnym badaniu.

([2]) Definicje i jednostki można znaleźć w dodatku 1

▼M7

biokoncentracji u ryb przez badanie narażenia drogą wodną. Jako dalsze uzasadnienie stosowania tej metody podano fakt, że potencjalne narażenie środowiskowe w przypadku tak słabo rozpuszczalnych substancji (tj. log K_{OW} > 5) może odbywać się w dużym stopniu drogą pokarmową (por. (40) (41) (42) (43) (44)). Z tego względu w niektórych opublikowanych rozporządzeniach dotyczących substancji chemicznych ([1]) odniesiono się do badań narażenia drogą pokarmową. Należy jednak pamiętać o tym, że zgodnie z opisaną tu metodą dokłada się starań, aby unikać narażenia na działanie substancji w fazie wodnej, dlatego też wartość BMF uzyskana dzięki zastosowaniu niniejszej metody badawczej nie może zostać bezpośrednio porównana z wartością BMF ustaloną w oparciu o wyniki badania w terenie (w ramach którego dopuszcza się możliwość narażenia na działanie substancji zarówno drogą wodną, jak i drogą pokarmową).

Ta sekcja niniejszej metody badawczej opiera się na wspomnianym protokole (38) i stanowi nową metodę, która nie została ujęta we wcześniejszej wersji metody badawczej C.13. Takie alternatywne badanie umożliwia bezpośrednie zbadanie ścieżki narażenia drogą pokarmową w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych.

W celu uzyskania informacji dotyczących tego, kiedy badanie narażenia drogą pokarmową może być preferowane w stosunku do badania narażenia drogą wodną, potencjalne osoby przeprowadzające badanie powinny się zapoznać z pkt 1–14 niniejszej metody badawczej. Przedstawiono różne kwestie dotyczące substancji, które należy uwzględnić przed przeprowadzeniem badania.

Stosowanie substancji badanych znakowanych izotopem może odbywać się przy uwzględnianiu tych samych kwestii, co w przypadku metody narażenia drogą wodną (por. pkt 6 i 65).

Metodę narażenia drogą pokarmową można stosować w celu zbadania większej liczby substancji w jednym badaniu, pod warunkiem że spełnione są pewne kryteria; przedstawiono je w sposób bardziej szczegółowy w pkt 112. W celu uproszczenia w niniejszej metodzie przedstawiono badanie z zastosowaniem tylko jednej substancji badanej.

Badanie narażenia drogą pokarmową jest pod wieloma względami podobne do metody narażenia drogą wodną z oczywistym wyjątkiem, jakim jest droga narażenia. Wiele aspektów przedstawionej tu metody pokrywa się zatem z metodą narażenia drogą wodną przedstawioną w poprzedniej sekcji. W miarę możliwości zastosowano odesłania do odpowiednich punktów w poprzedniej sekcji, aby jednak tekst pozostał czytelny i zrozumiały, pewna liczba powtórzeń jest nieunikniona.

ZASADA BADANIA

Można zastosować warunki przepływowe lub półstatyczne (por. pkt 4); zaleca się stosowanie warunków przepływowych w celu ograniczenia potencjalnego narażenia na działanie substancji badanej drogą wodną wskutek desorpcji ze wzbogaconej paszy lub odchodów. Badanie składa się z dwóch etapów: wchłaniania (karmienie paszą wzbogaconą badaną substancją) i wydalania (karmienie czystą paszą, niewzbogaconą badaną substancją) (por. pkt 16). Podczas fazy wchłaniania badanej grupie ryb podaje się codziennie ustaloną ilość komercyjnej paszy dla ryb o znanym składzie wzbogaconej substancją badaną. Najlepiej gdyby ryby zjadły całość podanego im pokarmu (*por.* pkt 141). Następnie podczas fazy wydalania podaje się rybom czystą, niewzbogaconą badaną substancją paszę dla ryb. W przypadku metody narażenia drogą wodną można zastosować w razie konieczności większą liczbę grup badanych, poddawanych narażeniu na działanie wzbogaconej substancji badanej o różnym stężeniu, w większości przypadków wysoce hydrofobowych organicznych substancji badanych wystarczy jednak jedna grupa badana (por. pkt 49 i 107). Jeżeli stosuje się warunki półstatyczne, ryby należy przenieść do nowego ośrodka lub do nowej komory badawczej pod koniec fazy wchłaniania (w przypadku gdy ośrodek lub aparatura wykorzystywane podczas fazy wchłaniania zostały zanieczyszczone substancją badaną poprzez ługowanie). Stężenia substancji badanej u ryb mierzy się w obu fazach badania. Poza grupą ryb, którym podawana jest wzbogacona

([1]) Do celów rozporządzenia (WE) nr 1907/2006 w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) (Dz.U. L 396 z 30.12.2006, s. 1) kwestię tę omówiono w „Poradniku dotyczącym wymagań w zakresie informacji i oceny bezpieczeństwa chemicznego”, rozdz. R.7c, R.7.10.3.1; R.7.10.4.1; oraz wykres R7,10-2.

▼M7

pasza (grupą badaną), grupa kontrolna ryb jest utrzymywana w identycznych warunkach i identycznie karmiona, z tym wyjątkiem, że komercyjna pasza dla ryb nie jest wzbogacona substancją badaną. Istnienie takiej grupy kontrolnej pozwala na oznaczenie ilościowe poziomów tła substancji badanej u ryb niepoddanych narażeniu i służy do celów porównawczych w odniesieniu do jakichkolwiek niekorzystnych skutków związanych z podaniem substancji chemicznej odnotowanych w grupie badanej lub grupach badanych ([1]). Pozwala również na porównanie stałych szybkości wzrostu między grupami w celach sprawdzenia, czy ryby spożyły podobne ilości podawanej paszy (wyjaśniając różne wartości stałych szybkości wzrostu, należy również uwzględnić potencjalne różnice dotyczące walorów smakowych paszy; por. pkt 138). Co istotne, że zarówno podczas fazy wchłaniania, jak i podczas fazy wydalania grupie badanej i grupie kontrolnej podaje się paszę o równoważnej wartości odżywczej.

Jak wynika z doświadczenia podmiotu, który opracował tę metodę, zazwyczaj wystarczy faza wchłaniania trwająca 7–14 dni (38) (39). Zakres ten powinien zminimalizować koszt przeprowadzania badania, zapewniając jednocześnie w przypadku większości substancji wystarczające narażenie. W niektórych przypadkach można jednak przedłużyć fazę wchłaniania (por. pkt 127). Podczas fazy wchłaniania stężenie substancji u ryby może nie osiągnąć stanu równowagi, w związku z czym przetwarzanie danych i wyniki tej metody opiera się zazwyczaj na kinetycznej analizie pozostałości w tkankach. (Uwaga: Można w tym przypadku zastosować równania służące oszacowaniu czasu pozostałego do osiągnięcia stanu równowagi, tak jak w badaniu narażenia drogą wodną – zob. dodatek 5). Faza wydalania rozpoczyna się, gdy rybom podaje się po raz pierwszy niewzbogaconą paszę, i trwa zazwyczaj do 28 dni lub do momentu, gdy substancji badanej nie można już oznaczyć ilościowo u całej ryby, którykolwiek moment nastąpi wcześniej. Fazę wydalania można skrócić lub przedłużyć powyżej 28 dni, w zależności od zmian, jakie z czasem następują w mierzonych stężeniach substancji chemicznej, i od wielkości ryby.

Metoda ta pozwala na określenie okresu półtrwania specyficznego dla substancji ($t_{1/2}$, ze stałej szybkości wydalania, k_2), wydajności przyswajania (wchłaniania na całej długości jelita, a), kinetycznego pokarmowego współczynnika biomagnifikacji (BMF_K), kinetycznego pokarmowego współczynnika biomagnifikacji skorygowanego pod kątem wzrostu (BMF_{Kg}), oraz kinetycznego pokarmowego współczynnika biomagnifikacji skorygowanego pod kątem zawartości lipidów ([2]) (BMF_{KL}) (lub kinetycznego pokarmowego współczynnika biomagnifikacji skorygowanego pod kątem wzrostu i zawartości lipidów, BMF_{KgL}) w odniesieniu do substancji badanej u ryby. W odniesieniu do metody narażenia drogą wodną wzrost masy ryby podczas badania poskutkuje rozcieńczeniem substancji badanej u rosnącej ryby, a zatem jeżeli nie skoryguje się (kinetycznego) BMF pod kątem wzrostu, będzie on niedoszacowany (por. pkt 162 i 163). Ponadto jeżeli szacuje się, że osiągnięto stan równowagi podczas fazy wchłaniania, można obliczyć orientacyjny BMF w stanie równowagi. Istnieją metody pozwalające na oszacowanie kinetycznego współczynnika biokoncentracji (BCF_K) na podstawie danych uzyskanych w badaniu narażenia drogą pokarmową (np. (44) (45) (46) (47) (48)). Zalety i wady takich metod omówiono w dodatku 8.

([1]) W przypadku większości substancji badanych byłoby najlepiej, gdyby nie zostały wykryte w wodzie próby kontrolnej. Stężenia tła powinny mieć znaczenie wyłącznie w przypadku naturalnie występujących materiałów (np. niektórych metali) i substancji wszechobecnych w środowisku.

([2]) Ponieważ BMF definiuje się jako stosunek stężenia substancji w organizmie do stężenia w paszy w stanie równowagi, lipidy uwzględnia się, dokonując korekty o zawartość lipidów w organizmie i w paszy, stąd trafniejsze jest określenia „korekta”. Podejście to różni się od „normalizacji” do ustalonej zawartości lipidów w organizmie, jaką się wykonuje w badaniu biokoncentracji przez narażenie drogą wodną.

▼M7

Badanie opracowano przede wszystkim dla słabo rozpuszczalnych niepolarnych substancji organicznych, w przypadku których wchłanianie i wydalanie u ryb przebiega w przybliżeniu zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu. W przypadku gdy wchłanianie i wydalanie badanej substancji u ryb nie przebiega w przybliżeniu zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu, wówczas należy zastosować modele bardziej złożone (zob. bibliografia w dodatku 5) i zasięgnąć rady specjalisty ds. biostatystyki lub farmakokinetyki.

BMF określa się zazwyczaj, stosując analizę substancji badanej u całej ryby (na podstawie mokrej masy). W stosownych przypadkach, jeżeli rybę podzielono na jadalne i niejadalne części, do celów badania można pobrać próbki konkretnych tkanek (np. mięśni, wątroby) (por. pkt 21). Ponadto można usunąć przewód pokarmowy i dokonać jego odrębnej analizy w celu określenia wpływu na stężenia u całej ryby w momentach pobierania próbek na końcu fazy wchłaniania i blisko początku fazy wydalania lub jako część podejścia bazującego na bilansie masy.

Należy zmierzyć zawartość lipidów u całej ryby, z której pobrano próbki, tak aby można było skorygować stężenia pod kątem zawartości lipidów, uwzględniając zawartość lipidów zarówno w paszy, jak i u ryby (por. pkt 56 i 57 oraz dodatek 7).

Należy zmierzyć i odnotować masę ryb u osobników, od których pobrano próbki, i połączyć je ze stężeniami analizowanej substancji chemicznej u tego osobnika (np. zgłoszonymi przy użyciu unikalnego kodu identyfikacyjnego przypisanego każdej rybie, od której pobrano próbki) w celu obliczenia wzrostu, jaki mógł wystąpić podczas badania. W miarę możliwości należy również zmierzyć długość całkowitą ryby ([1]). Dane dotyczące masy są również konieczne do oszacowania BCF z wykorzystaniem danych dotyczących wydalania z badania narażenia drogą pokarmową.

INFORMACJE DOTYCZĄCE SUBSTANCJI BADANEJ

Jak opisano w pkt 3 i 22, informacje dotyczące substancji badanej powinny być dostępne. Zazwyczaj nie jest konieczne stosowanie metody analitycznej w odniesieniu do pomiaru stężeń substancji badanej w wodzie; konieczne jest stosowanie metod o odpowiedniej czułości do mierzenia stężeń w paszy dla ryb i w tkankach ryb.

Metodę tę można stosować w celu zbadania większej liczby substancji w jednym badaniu. Substancje badane muszą być jednak zgodne ze sobą nawzajem, tak aby nie wchodziły w interakcje ani nie zmieniały swoich właściwości chemicznych przy wzbogacaniu nimi paszy dla ryb. Należy dążyć do tego, aby wyniki pomiarów w odniesieniu do każdej wspólnie badanej substancji nie różniły się znacznie od wyników, które uzyskano by w przypadku przeprowadzenia odrębnych badań dla każdej z badanych substancji. Należy ustalić w ramach wstępnej analizy, że każdą z substancji można odzyskać z wielokrotnie wzbogaconej paszy i z próbki tkanki ryby, i że będzie się ona charakteryzować: (i) wysokim poziomem odzysku (np. > 85 % wartości nominalnej); oraz (ii) niezbędną czułością na badanie. Całkowita dawka badanych wspólnie substancji powinna być niższa od łączonego stężenia, które może wywołać efekty toksyczne (por. pkt 51). Ponadto należy uwzględnić w planie badania możliwe niekorzystne skutki u ryb i potencjał w odniesieniu do skutków interakcji (np. skutków metabolicznych) związane z jednoczesnym badaniem wielu substancji. Należy unikać jednoczesnego badania substancji podatnych na dysocjację. Z punktu widzenia narażenia metoda ta jest również odpowiednia w przypadku złożonych mieszanin (por. pkt 13, chociaż będą miały zastosowanie te same ograniczenia dotyczące analizy, co w przypadku każdej innej metody).

WAŻNOŚĆ BADANIA

Aby badanie było ważne, spełnione muszą być następujące warunki (por. pkt 24):

— różnice w temperaturze wody nie przekraczają ± 2 °C w grupach poddanych działaniu substancji chemicznej lub w grupach kontrolnych;

([1]) Podczas badania należy odnotować również długość całkowitą, gdyż stanowi ona dobry wskaźnik świadczący o wystąpieniu niekorzystnego skutku.

▼M7

— stężenie rozpuszczonego tlenu nie spada poniżej 60 % wartości nasycenia powietrza;

— stężenie substancji badanej w paszy dla ryb przed fazą wchłaniania i pod koniec tej fazy mieści się w zakresie ± 20 % (w oparciu o co najmniej trzy próbki w obu punktach pobierania próbek);

— podczas wstępnej analizy wzbogaconej paszy należy wykazać wysoki stopień jednorodności substancji w paszy; co najmniej trzy wartości stężenia substancji w próbkach pobranych na początku badania nie mogą odbiegać od średniego stężenia o więcej niż ± 15 %);

— stężenia substancji badanej w niewzbogaconej paszy lub tkankach ryb kontrolnych nie są wykrywalne lub są obecne wyłącznie na zwykłych poziomach wykrywalności w porównaniu z próbkami poddanymi działaniu substancji chemicznej;

— upadkowość lub inne niekorzystne skutki/choroby zarówno w grupie kontrolnej, jak i badanej powinny wynosić ≤ 10 % na koniec badania; jeżeli z jakiegokolwiek powodu badanie przedłuży się, niekorzystne skutki w obu grupach wynoszą ≤ 5 % miesięcznie i ≤ 30 % łącznie. Znaczne różnice w średnim wzroście między grupą badaną a grupą kontrolną ryb, od których pobierano próbki, mogą wskazywać na wystąpienie efektu toksycznego substancji badanej.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Jeżeli laboratorium nie przeprowadzało jeszcze takiego badania lub wprowadzono istotne zmiany w badaniu (takie jak zmiana odmiany lub dostawcy ryb, inny gatunek ryb, znacząca zmiana wielkości ryb, paszy dla ryb lub metody wzbogacania itp.), zaleca się przeprowadzenie badania biegłości technicznej przy zastosowaniu substancji odniesienia. Substancję odniesienia stosuje się przede wszystkim w celu ustalenia, czy technika wzbogacania paszy jest odpowiednia dla zapewnienia maksymalnej jednorodności i biodostępności substancji badanych. Jednym z przykładów użytych w przypadku niepolarnych hydrofobowych substancji jest heksachlorobenzen (HCB), należy jednak rozważyć stosowanie innych substancji, co do których dostępne są wiarygodne dane dotyczące wchłaniania i biomagnifikacji ze względu na właściwości HCB stwarzające zagrożenie ([1]). W przypadku wykorzystania substancji odniesienia należy przedstawić w sprawozdaniu z badania podstawowe informacje na jej temat, w tym nazwę, czystość, numer CAS, strukturę, dane dotyczące toksyczności (jeżeli są dostępne), tak jak w przypadku substancji badanych (por. pkt 3 i 22).

OPIS METODY

Aparatura

Należy stosować materiały i aparaturę jak opisano w metodzie narażenia drogą wodną (por. pkt 26). Należy stosować przepływowy lub statyczny układ badawczy z wymianą, które zapewnią wystarczającą objętość wody rozcieńczającej w zbiornikach. Należy odnotowywać natężenie przepływu.

Woda

Należy stosować wodę do badania, jak opisano w metodzie narażenia drogą wodną (por. pkt 27–29). Ośrodek badania powinien charakteryzować się opisanymi właściwościami, a jego jakość powinna pozostać stała podczas całego badania. Naturalna zawartość cząstek oraz całkowity węgiel organiczny powinny być jak najniższe (≤ 5 mg/l cząstek stałych; ≤ 2 mg/l całkowitego węgla organicznego) przed rozpoczęciem badania. Pomiar całkowitego węgla organicznego konieczny jest tylko przed rozpoczęciem badania jako część charakterystyki wody użytej do badania (por. pkt 53).

([1]) HCB widnieje w wykazie w załącznikach A i C do konwencji sztokholmskiej i w załącznikach I i II do rozporządzenia (WE) nr 850/2004 dotyczącego trwałych zanieczyszczeń organicznych (Dz.U. L 158 z 30.4.2004, s. 7).

▼M7

Pasza

Zaleca się stosowanie komercyjnie dostępnej paszy dla ryb (pływającej lub wolno tonącej paszy w postaci peletek), scharakteryzowanej co najmniej pod kątem zawartości białka i tłuszczu. Pasza powinna składać się z peletek jednakowego rozmiaru, aby zwiększyć skuteczność narażenia przez paszę, tj. aby ryba zjadła więcej paszy, nie zaś zjadała większe kawałki i pozostawiała mniejsze. Rozmiar peletek powinien być dostosowany do rozmiaru ryb na początku badania (np. w przypadku ryb o długości całkowitej 3–7 cm można użyć peletek o średnicy 0,6–0,85 mm, a w przypadku ryb o długości całkowitej 6–12 cm można użyć peletek o średnicy 0,85–1,2 mm. Można dostosować rozmiar peletek do wzrostu ryb na początku fazy wydalania. Przykład odpowiedniego składu paszy w postaci dostarczonej komercyjnie podano w dodatku 7.Przy opracowywaniu niniejszej metody zazwyczaj stosowano paszę doświadczalną o całkowitej zawartości lipidów 15–20 % (w/w). Pasza dla ryb o tak wysokim stężeniu lipidów może nie być dostępna w niektórych regionach. W takich przypadkach można w razie konieczności przeprowadzić badania przy niższym poziomie stężenia lipidów w paszy, dostosowując częstotliwość karmienia w taki sposób, by utrzymać dobry stan zdrowia ryb (w oparciu o badanie wstępne). Należy zmierzyć i odnotować całkowitą zawartość lipidów w paszy grupy badanej i grupy kontrolnej przed rozpoczęciem badania i na koniec fazy wchłaniania. Należy przedstawić w sprawozdaniu z badania szczegóły dostarczone przez dostawcę komercyjnej paszy dotyczące analizy składników odżywczych, wilgotności, włókna i popiołu, oraz w miarę możliwości minerałów i pozostałości pestycydów (np. najważniejszych „standardowych” zanieczyszczeń).

Podczas wzbogacania paszy substancją badaną należy dołożyć wszelkich starań, aby zapewnić jednorodność w całej paszy używanej do badania. Przy wyborze stężenia substancji badanej w paszy dla grupy badanej należy uwzględnić czułość techniki analitycznej, toksyczność substancji badanej (NOEC, jeżeli jest znany) oraz odpowiednie dane fizykochemiczne. Substancję odniesienia, jeżeli jest stosowana, należy najlepiej włączyć w stężeniu ok. 10 % stężenia substancji badanej (lub w każdym razie najniższym stosowanym stężeniu), podlegającym analizie czułości (np. w przypadku heksachlorobenzenu uznano, że stężenie w paszy wynoszące 1–100 μg/g jest dopuszczalne; por. (47) aby uzyskać więcej informacji na temat wydajności przyswajania HCB).

Paszę dla ryb można wzbogacić substancją badaną na kilka sposobów, w zależności od właściwości fizycznych i rozpuszczalności substancji (zob. dodatek 7, aby uzyskać szczegółowe informacje na temat metod wzbogacania):

— jeżeli substancja jest rozpuszczalna i stabilna w trójglicerydach, należy przed wymieszaniem z paszą dla ryb rozpuścić ją w niewielkiej ilości oleju z ryb lub jadalnego oleju roślinnego. W takim przypadku należy dołożyć starań, aby uniknąć przygotowania dawki o zbyt wysokiej zawartości lipidów, uwzględniając naturalną zawartość lipidów we wzbogaconej paszy, dodając minimalną znaną ilość wymaganego oleju, aby osiągnąć rozłożenie substancji badanej w paszy i jej jednorodność; lub

— paszę należy wzbogacić przy użyciu odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego, o ile nie zagraża to jednorodności i biodostępności (może się zdarzyć, że w konsekwencji parowania rozpuszczalnika w paszy uformują się (mikro)kryształki substancji badanej, przy czym nie istnieje żadna prosta metoda, aby udowodnić, że nie miało to miejsca; por. (49)); lub

— nielepką ciecz należy dodać bezpośrednio do paszy dla ryb, należy ją jednak dobrze wymieszać, aby uzyskać jednorodność i ułatwić przyswajanie. Technika mieszania powinna zapewniać jednorodność wzbogaconej paszy.

▼M7

W kilku przypadkach, np. w przypadku substancji badanych o mniejszych właściwościach hydrofobowych, gdy istnieje większe prawdopodobieństwo zdesorbowania z paszy, może być konieczne pokrycie przygotowanych peletek paszy niewielką ilością oleju z kukurydzy/ryb (zob. pkt 142). W takich przypadkach należy poddać tej samej procedurze paszę podawaną grupie kontrolnej oraz przygotowywaną paszę końcową stosowaną do pomiaru lipidów.

Jeżeli stosuje się substancję odniesienia, wyniki powinny być porównywalne z danymi na temat badań pochodzącymi z literatury, które to badania przeprowadzano w podobnych warunkach, i stosując porównywalną częstotliwość karmienia (por. pkt 45), a parametry specyficzne dla substancji odniesienia powinny spełniać odpowiednie kryteria przedstawione w pkt 113 (tiret trzecie, czwarte i piąte).

Jeżeli jako nośnik substancji badanej stosuje się olej lub nośnik rozpuszczalnikowy, należy wymieszać taką sama ilość tego samego nośnika (wyłączając substancję badaną) z paszą podawaną grupie kontrolnej w celu zachowania równoważności w stosunku do wzbogaconej paszy. Co istotne, że zarówno podczas fazy wchłaniania, jak i podczas fazy wydalania grupie badanej i grupie kontrolnej podaje się paszę o równoważnej wartości odżywczej.

Wzbogaconą paszę należy przechowywać w warunkach zapewniających możliwość utrzymania stabilności substancji badanej dodanej do paszy (np. w warunkach chłodniczych), a warunki te należy odnotować.

Wybór gatunku ryb

Można zastosować gatunek ryb wskazany w odniesieniu do narażenia drogą wodną (*por.* pkt 32 i dodatek 3). Przed publikacją niniejszej metody badawczej w badaniach bioakumulacji pokarmowej wykorzystywano zazwyczaj pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*), karpia (*Cyprinus carpio*) i strzeblę wielkogłową (*Pimephales promelas*). Gatunek doświadczalny powinien wykazywać zachowanie żywieniowe charakteryzujące się szybkim spożywaniem podanej dawki paszy, aby ograniczyć do minimum jakiekolwiek czynniki wpływające na stężenie substancji badanej w paszy (np. wymywanie do wody i możliwość narażenia drogą wodną). Należy wykorzystywać ryby mieszczące się w zalecanym zakresie rozmiaru/masy (por. dodatek 3). Ryby nie powinny być na tyle małe, aby zagrażało to prostej analizie poszczególnych przypadków. Badanie gatunku w stadium szybkiego wzrostu może skomplikować interpretacje danych, a duża szybkość wzrostu może wpłynąć na obliczenia wydajności przyswajania ([1]).

utrzymywanie ryb

Aklimatyzacja, upadkowość i kryteria dopuszczalności chorób są takie same jak w przypadku metody narażenia drogą wodną przed rozpoczęciem badania (por. pkt 33–35).

PRZEPROWADZENIE BADANIA

Czynności poprzedzające badanie i badanie ustalające zakres

Czynności analityczne poprzedzające badanie są niezbędne, aby wykazać ustanie działania substancji we wzbogaconej paszy / wzbogaconej tkance ryby. Badanie ustalające zakres służące wybraniu odpowiedniego stężenia w paszy nie zawsze jest konieczne. Aby wykazać brak zaobserwowanych niekorzystnych skutków i ocenić walory smakowe wzbogaconej paszy, czułość metody analitycznej w odniesieniu do tkanek ryb i paszy dla ryb oraz wybór odpowiedniej częstotliwości karmienia i przerw między pobieraniem próbek w trakcie fazy wydalania itp., można przeprowadzić wstępne doświadczenia dotyczące karmienia, nie są

([1]) W odniesieniu do szybkiego wzrostu w trakcie fazy wchłaniania rzeczywista częstotliwość karmienia spadnie poniżej poziomu ustalonego na początku narażenia.

▼M7

jednak one obowiązkowe. Wstępne badanie może być cenne przy szacowaniu liczby ryb potrzebnych do pobrania próbek w trakcie fazy wydalania. Może ono przyczynić się do znacznego ograniczenia liczby wykorzystanych ryb, w szczególności w przypadku substancji badanych szczególnie podatnych na metabolizm.

Warunki narażenia na działanie substancji

Czas trwania fazy wchłaniania

Faza wchłaniania trwająca 7–14 dni jest zazwyczaj wystarczająca; w tym czasie jednej grupie podaje się paszę dla grupy kontrolnej, a drugiej grupie ryb paszę doświadczalną w ustalonej dawce w zależności od badanego gatunku i warunków doświadczalnych, np. 1–2 % masy ciała (mokrej masy) w przypadku pstrąga tęczowego. Częstotliwość karmienia powinna zostać dobrana w taki sposób, aby nie dopuścić do szybkiego wzrostu i dużego zwiększenia zawartości lipidów. W razie konieczności można wydłużyć fazę wchłaniania, opierając się na praktycznych doświadczeniach z wcześniejszych badań lub wiedzy na temat wchłaniania/wydalania substancji badanej (lub substancji analogicznej) u ryby. Początek badania definiuje się jako moment pierwszego podania wzbogaconej paszy. Dzień doświadczalny trwa od momentu karmienia i kończy się niedługo przez porą następnego karmienia (np. jedną godzinę). Pierwszy dzień doświadczalny fazy wchłaniania trwa zatem od momentu pierwszego podania wzbogaconej paszy i kończy się na krótko przed drugim podaniem wzbogaconej paszy. W praktyce faza wchłaniania kończy się na krótko przed (np. jedną godzinę) pierwszym podaniem paszy niewzbogaconej substancją badaną, gdyż ryby będą nadal trawiły wzbogaconą paszę i wchłaniały substancję badaną przez kolejne 24 godziny. Istotne jest, aby upewnić się, że osiągnięto wystarczająco wysokie (nietoksyczne) skażenie organizmu substancją badaną w odniesieniu do metody analitycznej, aby w trakcie fazy wydalania można było zmierzyć spadek o przynajmniej jeden rząd wielkości. W szczególnych przypadkach można zastosować wydłużoną fazę wchłaniania (do 28 dni) z dodatkowym pobieraniem próbek, aby uzyskać wgląd w kinetykę wchłaniania. Podczas wchłaniania stężenie u ryby może nie osiągnąć stanu równowagi. Tak jak w badaniu narażenia drogą wodną można w tym przypadku zastosować równania służące oszacowaniu czasu potrzebnego do osiągnięcia stanu równowagi, służące jako wskaźnik prawdopodobnego czasu potrzebnego do osiągnięcia u ryb znacznych stężeń (por. dodatek 5).

W niektórych przypadkach może być wiadomo, że ze względu na słabą czułość analityczną albo niską wydajność przyswajania, wchłanianie substancji u ryby przez 7–14 dni będzie przy stosowanym stężeniu w paszy niewystarczające do osiągnięcia odpowiednio wysokiego stężenia u ryby tak, aby możliwa była analiza spadku przynajmniej jednego rzędu wielkości w podczas wydalania. W takich przypadkach korzystne może być wydłużenie początkowej fazy karmienia powyżej 14 dni lub, szczególnie w odniesieniu do wysoce metabolizowanych substancji, należy rozważyć wyższe stężenie w pokarmie. Należy jednak zadbać o to, aby podczas wchłaniania utrzymywać skażenie organizmu poniżej (szacowanego) najwyższego stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych, przewlekłych zmian (NOEC) w tkance ryby (por. pkt 138).

Czas trwania fazy wydalania

Wydalanie zazwyczaj trwa do 28 dni, licząc od momentu podania grupie badanej ryb czystej, niewzbogaconej paszy po zakończeniu fazy wchłaniania. Wydalanie rozpoczyna się wraz z pierwszym podaniem „niewzbogaconej” paszy, nie zaś bezpośrednio po ostatnim podaniu „wzbogaconej” paszy, gdyż ryby będą nadal trawiły paszę i wchłaniały substancję badaną przez następne 24 godziny, jak przedstawiono w pkt 126. Pierwszą próbkę podczas fazy wydalania pobiera się zatem niedługo przed drugim podaniem niewzbogaconej paszy. Zaplanowano taki okres wydalania, aby wykryć substancje o potencjalnym okresie półtrwania do 14 dni, który jest zgodny z okresem substancji wykazujących zdolność do bioakumulacji ([1]), okres 28 dni obejmuje zatem dwa okresy półtrwania takich

([1]) W badaniu narażenia drogą wodną 14-dniowy okres półtrwania odpowiadałby BCF o wartości ok. 10 000 L/kg przy wykorzystaniu ryb o masie 1 g i odpowiadającej szybkości wchłaniania ok. 500 L/kg na dobę (zgodnie z równaniem podanym w Sijm *et al.* (46)).

▼M7

substancji. W przypadkach substancji wykazujących bardzo dużą zdolność do bioakumulacji korzystne może być wydłużenie fazy wydalania (jeżeli wskazano tak w badaniu wstępnym).

Jeżeli substancja ulega wydalaniu bardzo powoli, tak, że nie można określić dokładnego okresu półtrwania w fazie wydalania, informacje nadal mogą wystarczyć na potrzeby oceny, aby wyznaczyć wysoki poziom bioakumulacji. Z kolei jeżeli substancja jest wydalana tak szybko, że nie można wyznaczyć wiarygodnego stężenia w czasie zerowym (stężenia na końcu wchłaniania / na początku wydalania, $C_{0,d}$) ani k_2, można zachowawczo oszacować k_2 (por. dodatek 7).

Jeżeli analizy ryb w krótszych odstępach czasu (np. 7 lub 14 dni) wykażą, że substancja uległa wydaleniu poniżej poziomów oznaczenia ilościowego przed upływem pełnego okresu 28 dni, można zaprzestać pobierania następnych próbek i zakończyć badanie.

W kilku przypadkach może się zdarzyć, że nie wystąpi żadne mierzalne wchłanianie substancji badanej na koniec okresu wchłaniania (lub przy drugiej próbie w okresie wydalania). Jeżeli można wykazać, że: (i) spełnione są kryteria ważności przedstawione w pkt 113; oraz (ii) brak wchłaniania nie wynika z innego niedociągnięcia w badaniu (np. zbyt krótki czas wchłaniania, wady techniki wzbogacania paszy prowadzące do słabej biodostępności, brak czułości w metodzie analitycznej, niespożywanie paszy przez ryby itp.), możliwe jest zakończenie badania bez konieczności jego ponownego przeprowadzania z zastosowaniem dłuższego czasu wchłaniania. Jeżeli w ramach wstępnych czynności wskazano, że może chodzić o taki przypadek, może być zalecane przeprowadzenie w miarę możliwości analizy odchodów w kierunku niestrawionej substancji badanej jako części podejścia bazującego na „bilansie masy”.

Liczba ryb doświadczalnych

Podobnie jak w przypadku badania narażenia drogą wodną, należy wybierać ryby o podobnej masie i długości, tak aby masa najmniejszej z nich nie była mniejsza niż dwie trzecie masy największej z ryb (por. pkt 40–42).

Wybór łącznej liczby ryb użytych do badania powinien opierać się na harmonogramie pobierania próbek (minimum jedna próbka na koniec fazy wchłaniania i od czterech do sześciu próbek podczas fazy wydalania, zależnie jednak od czasu trwania faz) i powinno się w nim uwzględnić czułość techniki analitycznej, prawdopodobne osiągnięte stężenie na koniec fazy wchłaniania (w oparciu o dotychczasową wiedzę) i czas trwania wydalania (jeżeli pozwala na to stan dotychczasowej wiedzy). Za każdym razem należy pobrać próbki od pięciu do dziesięciu ryb, przy czym pomiar parametrów wzrostu (masy i długości całkowitej) powinien poprzedzać analizę substancji chemicznej lub analizę lipidów.

Z uwagi na nieodłączne różnice w rozmiarze ryb, szybkości ich wzrostu i ich fizjologii oraz prawdopodobne różnice w ilości podawanej paszy spożywanej przez każdą z ryb, aby odpowiednio ustalić średnie stężenie i jego zmienność, w każdym odstępie czasu należy pobrać próbki od co najmniej pięciu ryb z grupy badanej i od pięciu ryb z grupy kontrolnej. Jest prawdopodobne, że różnice wśród wykorzystywanych ryb będą miały większy wpływ na ogólne niekontrolowane różnice w badaniu niż różnice nieodłącznie związane ze stosowanymi metodami analitycznymi, uzasadnione jest zatem stosowanie w niektórych przypadkach do dziesięciu ryb na punkt pobierania próbek. Jeżeli stężenia tła substancji badanej u ryb kontrolnych nie są jednak możliwe do zmierzenia na początku okresu wydalania, analiza substancji chemicznej u dwóch–trzech ryb kontrolnych podczas ostatniego pobierania próbek może być wystarczająca tylko wtedy, jeżeli we wszystkich punktach pobierania próbek dokonuje się pomiaru pozostałych ryb kontrolnych pod względem masy i długości całkowitej (tak, aby dokonać pomiaru wzrostu u takiej samej liczby ryb badanych i ryb kontrolnych). Ryby należy przechowywać i ważyć oddzielnie (nawet jeżeli okazuje się konieczne późniejsze połączenie wyników próbek) oraz mierzyć ich długość całkowitą.

▼M7

W przypadku standardowego badania, obejmującego na przykład okres wydalania trwający 28 dni, w tym pięć próbek pobieranych w okresie wydalania, oznacza to wykorzystanie 59–120 ryb z grupy badanej i 50–110 ryb z grupy kontrolnej, przy założeniu że technika analityczna stosowana względem substancji pozwala na przeprowadzenie analizy zawartości lipidów na tych samych rybach. Jeżeli nie można przeprowadzić analizy zawartości lipidów na tych samych rybach, na których przeprowadza się analizę substancji chemicznej, a wykorzystanie ryb kontrolnych wyłącznie do przeprowadzenia analizy lipidów również nie jest wykonalne (por. pkt 56), potrzebne byłoby dodatkowe 15 ryb (trzy z podstawowej populacji na początku badania, po trzy z grupy kontrolnej i z grupy badanej na początku wydalania oraz po trzy z grupy kontrolnej i z grupy badanej na koniec doświadczenia). Przykładowy harmonogram pobierania próbek wraz z liczbami ryb można znaleźć w dodatku 4.

Obciążenie

Podobnie jak w przypadku metody narażenia drogą wodną należy stosować wysoką proporcję objętości wody do masy ryb (por. pkt 43 i 44). Chociaż wskaźnik obciążenia pod względem masy ryb do objętości wody nie ma wpływu na stężenie ekspozycyjne w badaniu, zaleca się, aby wynosił on 0,1–1,0 g ryb (mokra masa) na litr wody na dobę, aby utrzymać odpowiednie stężenia rozpuszczonego tlenu i zminimalizować stres u organizmów doświadczalnych.

Pasza doświadczalna i karmienie

Podczas okresu aklimatyzacji należy podawać rybom odpowiednią paszę, jak opisano powyżej (pkt 117). Jeżeli badanie prowadzone jest w warunkach przepływowych, należy wstrzymać przepływ wody na czas karmienia ryb.

Podczas badania pasza przeznaczona dla grupy badanej powinna być zgodna z powyższym opisem (pkt 116–121). Poza czynnikami specyficznymi dla substancji, czułością analityczną, spodziewanym stężeniem w paszy w warunkach otoczenia i poziomami toksyczności przewlekłej / skażeniami organizmu, dokonując wyboru docelowego stężenia wzbogacania, należy uwzględnić walory smakowe paszy (aby ryby nie unikały jej spożywania). Należy udokumentować w sprawozdaniu nominalne stężenie wzbogacania substancji badanej. Na podstawie doświadczenia można stwierdzić, że stężenia wzbogacania znajdujące się w przedziale 1–1000 µg/g stanowią praktyczny zakres stosowany w odniesieniu do substancji badanych, które nie wykazują szczególnego mechanizmu toksycznego. W odniesieniu do substancji działających za pośrednictwem niespecyficznego mechanizmu poziomy pozostałości w tkankach nie powinny przekraczać 5 µmol/g lipidów, gdyż powyżej tego poziomu pozostałości mogą z dużym prawdopodobieństwem wywierać wpływ długoterminowy (19) (48) (50) ([1]). W odniesieniu do innych substancji należy dołożyć starań, aby nie wystąpiły żadne niekorzystne skutki wynikające ze zakumulowanego narażenia (por. pkt 127). Dzieje się tak w szczególności w przypadku, gdy jednocześnie bada się więcej niż jedną substancję (por. pkt 112).

Wzbogacenie paszy dla ryb odpowiednią ilością substancji badanej można przeprowadzić na trzy różne sposoby, jak opisano w pkt 119 i w dodatku 7. Takie metody i procedury wzbogacania paszy należy udokumentować w sprawozdaniu. Rybom kontrolnym podaje się niewzbogaconą paszę zawierającą taką samą ilość niewzbogaconego nośnika w postaci oleju, jeżeli zastosowano go we wzbogaconej paszy podawanej podczas fazy wchłaniania, lub poddaną działaniu „czystego” rozpuszczalnika, jeżeli zastosowano nośnik w postaci rozpuszczalnika do przygotowania paszy dla grupy badanej. Wzbogaconą i niewzbogaconą paszę należy poddać analitycznym pomiarom dotyczącym stężenia substancji badanej przynajmniej trzykrotnie przed rozpoczęciem fazy wchłaniania i na jej końcu. Po narażeniu na działanie wzbogaconej paszy (faza wchłaniania) rybom (z obu grup) podaje się niewzbogaconą paszę (faza wydalania).

Rybom podaje się ustalone dawki (w zależności od gatunku; np. ok. 1–2 % mokrej masy ciała na dzień w przypadku pstrąga tęczowego). Częstotliwość karmienia powinna zostać dobrana w taki sposób, aby nie dopuścić do szybkiego wzrostu i dużego zwiększenia zawartości lipidów. Należy odnotować dokładną częstotliwość karmienia ustaloną podczas doświadczenia. Początkowe karmienie powinno opierać się na harmonogramie pomiarów masy podstawowej populacji

([1]) Ponieważ rzeczywiste wewnętrzne stężenia można wyznaczyć dopiero po przeprowadzeniu badania, potrzebne są ich spodziewane wartości szacunkowe (np. opierające się na spodziewanych BMF i stężeniu w paszy; por. równanie A5.8 w dodatku 5).

▼M7

zaraz przed rozpoczęciem badania. Ilość paszy należy dostosować do mokrej masy ryb, od których pobrano próbki przy każdym pobieraniu próbek, aby uwzględnić wzrost w trakcie doświadczenia. Masę i długość ryb w zbiornikach badawczych i kontrolnych można oszacować z masy i długości całkowitej ryb wykorzystanych w przypadku każdego pobierania próbek; nie należy ważyć ani mierzyć ryb pozostających w zbiornikach badawczych i kontrolnych. Istotne jest, aby utrzymać tę samą ustaloną częstotliwość karmienia podczas całego doświadczenia.

Należy obserwować ryby podczas karmienia, upewniając się, że spożywają one w widoczny sposób całość podanej paszy, aby zagwarantować, że w obliczeniach zostanie użyta odpowiednia częstotliwość spożywania pokarmu. Dokonując wyboru częstotliwości karmienia, która zapewni spożycie całości paszy podawanej raz dziennie, należy uwzględnić przeprowadzone wstępne doświadczenia dotyczące karmienia lub zdobyte wcześniej doświadczenie. W przypadku gdy ryby konsekwentnie pozostawiają niespożytą paszę, można zalecić podzielenie dawki na rzecz dodatkowego okresu karmienia w każdym dniu doświadczalnym (np. zastąpić karmienie raz dziennie karmieniem połową dawki dwa razy dziennie). Jeżeli jest to konieczne, należy przeprowadzać drugie karmienie o stałych porach tak, aby od momentu karmienia do momentu pobierania próbek upłynął możliwie maksymalnie okres (np. moment drugiego karmienia ustalony jest w pierwszej połowie dnia doświadczalnego).

Chociaż zazwyczaj ryby szybko spożywają paszę, ważne jest, aby upewnić się, że substancja pozostaje zaadsorbowana w paszy. Należy dołożyć starań, aby uniknąć rozproszenia substancji badanej z paszy do wody, co naraziłoby ryby na dodatkowe stężenie substancji badanej w wodzie poza narażeniem drogą pokarmową. Można to osiągnąć usuwając niespożytą paszę (i odchody) ze zbiorników badawczych i kontrolnych w przeciągu godziny od karmienia, najlepiej jednak w przeciągu 30 minut. Ponadto można zastosować system, w ramach którego woda podlega ciągłemu oczyszczaniu przez filtr z węglem aktywnym, aby wszystkie „rozproszone” zanieczyszczenia podlegały absorpcji. Systemy przepływowe mogą być pomocne w szybkim spłukiwaniu cząstek paszy i rozproszonych substancji ([1]). W niektórych przypadkach niewielka modyfikacja techniki przygotowywania wzbogaconej paszy może pomóc w złagodzeniu tego problemu (zob. pkt 119).

Światło i temperatura

Tak jak w przypadku metody narażenia drogą wodną (por. pkt 48) zaleca się fotoperiod wynoszący 12–16 godzin i dostosowanie temperatury (± 2 °C) do wymagań wykorzystywanego gatunku doświadczalnego (por. dodatek 3). Rodzaj oraz właściwości oświetlenia powinny być znane i udokumentowane.

Kontrole

Należy stosować jedną grupę kontrolną, w której ryby karmione są taką samą dawką jak ryby z grupy badanej, lecz paszą niezawierającą substancji badanej. Jeżeli w celu wzbogacenia paszy stosowano nośnik w postaci oleju lub rozpuszczalnika w grupie badanej, należy poddać dokładnie takim samym zabiegom paszę podawaną grupie kontrolnej, z tym że bez dodawania substancji badanej, tak aby pasze grupy badanej i grupy kontrolnej były równoważne (por. pkt 121 i 139).

([1]) Obecność substancji badanej w ośrodku badawczym wynikająca z wydalania przez ryby lub wymywania substancji z paszy może być nie do uniknięcia. Jednym z rozwiązań jest zatem mierzenie stężenia substancji w wodzie pod koniec okresu wchłaniania, szczególnie w przypadku stosowania warunków półstatycznych, mające pomóc ustalić, czy miało miejsce narażenie drogą wodną.

▼M7

Częstotliwość pomiarów jakości wody

Warunki opisane w metodzie narażenia drogą wodną odnoszą się również do niniejszej metody, z tym że pomiar całkowitego węgla organicznego konieczny jest tylko przed rozpoczęciem badania jako część charakterystyki wody użytej do badania (por. pkt 53).

Pobieranie próbek oraz analiza ryb i paszy

Analiza próbek paszy

Próbki paszy grupy badanej i grupy kontrolnej należy poddać analizie w zakresie substancji badanej przynajmniej trzykrotnie oraz analizie w zakresie zawartości lipidów przynajmniej przed rozpoczęciem fazy wchłaniania i na jej końcu. Metody analizy i procedury zapewniania jednorodności paszy należy zawrzeć w sprawozdaniu.

Należy dokonać analizy próbek na obecność substancji badanej przy zastosowaniu standardowych i zweryfikowanych metod. Należy przeprowadzić czynności poprzedzające badanie w celu ustalenia granicy oznaczalności, odsetka ustania działania substancji, zakłóceń i różnorodności analitycznej w zakładanym próbnym materiale. Jeżeli badaniu poddawany jest materiał znakowany izotopem, należy uwzględnić podobne kwestie jak w przypadku metody narażenia drogą wodną, przy czym analizę wody należy zastąpić analizą paszy (por. pkt 65).

Analiza ryb

Podczas każdego pobierania próbek od ryb zostaną one pobrane od 5–10 osobników z grupy poddanej narażeniu i grupy kontrolnej (w niektórych przypadkach można ograniczyć liczbę ryb kontrolnych; por. pkt 134).

Pobieranie próbek powinno odbywać się o tej samej porze każdego dnia doświadczalnego (zależnie od pory karmienia) i powinno być tak zaplanowane w czasie, aby zminimalizować prawdopodobieństwo pozostania paszy w jelicie podczas fazy wchłaniania i we wczesnej fazie wydalania, aby zapobiec uwzględnieniu błędnych wartości całkowitego stężenia substancji badanej (tj. ryby, od których pobrano próbki należy usuwać na koniec dnia doświadczalnego, pamiętając o tym, że dzień doświadczalny rozpoczyna się wraz z karmieniem, a kończy wraz z następnym karmieniem ok. 24 godziny później. Wydalanie rozpoczyna się wraz z pierwszym podaniem niewzbogaconej paszy; por. pkt 128). Pierwsza próbka pobrana podczas fazy wydalania (niedługo przed drugim podaniem niewzbogaconej paszy) jest ważna, gdyż stosuje się ekstrapolację z dnia poprzedzającego ten pomiar do oszacowania stężenia w czasie zerowym ($C_{0,d}$, stężenie u ryby pod koniec wchłaniania / na początku wydalania). Ewentualnie można usunąć przewód pokarmowy ryby i osobno dokonać jego analizy pod koniec wchłaniania oraz pierwszego i trzeciego dnia wydalania.

Podczas każdego pobierania próbek należy usuwać ryby z obu naczyń badawczych i poddawać tym samym czynnościom, jak opisano w przypadku metody narażenia drogą wodną (por. pkt 61–63).

Stężenia substancji badanej u całej ryby (mokra masa) mierzy się co najmniej po zakończeniu fazy wchłaniania i podczas fazy wydalania zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupie badanej. Zaleca się ustalenie czterech do sześciu punktów pobierania próbek podczas fazy wydalania (np. 1., 3., 7., 14. i 28. dnia). Można ewentualnie włączyć dodatkowy punkt pobierania próbek po 1–3 dniach wchłaniania w celu oszacowania wydajności przyswajania z fazy liniowej wchłaniania przez ryby, gdy są wciąż na początku okresu narażenia. Istnieją dwa główne odchylenia od tego harmonogramu: (i) jeżeli stosuje się wydłużoną fazę wchłaniania do celów zbadania kinetyki wchłaniania, podczas fazy wchłaniania będą ustalone dodatkowe punkty pobierania próbek, konieczne będzie zatem włączenie dodatkowych ryb (por. pkt 126); (ii) jeżeli badanie zakończono pod

▼M7

koniec fazy wchłaniania z uwagi na brak wymiernego wchłaniania (por. pkt 131). Poszczególne ryby, od których pobierane są próbki, należy zważyć (i zmierzyć ich długość całkowitą), aby można było wyznaczyć stałe szybkości wzrostu. Można również zmierzyć stężenia substancji w poszczególnych tkankach ryby (jadalnych i niejadalnych częściach) pod koniec okresu wchłaniania i w wybranych momentach w trakcie wydalania. Jeżeli badaniu poddawany jest materiał znakowany izotopem, należy uwzględnić podobne kwestie, co w przypadku metody narażenia drogą wodną, przy czy analizę wody należy zastąpić analizą paszy (por. pkt 65).

W przypadku okresowego stosowania substancji odniesienia (por. pkt 25) zaleca się, aby w grupie badanej mierzono stężenia pod koniec wchłaniania i we wszystkich momentach w trakcie wydalania określonych w odniesieniu do substancji badanej (u całych ryb); w grupie kontrolnej analiza stężeń konieczna jest tylko pod koniec wchłaniania (u całych ryb). W niektórych okolicznościach (na przykład jeżeli techniki analityczne odnoszące się do substancji badanej i do substancji odniesienia nie są ze sobą zgodne tak, że aby postępować zgodnie z harmonogramem pobierania próbek konieczne by było wykorzystanie dodatkowej ryby) można zastosować następujące inne podejście, aby zminimalizować liczbę niezbędnych dodatkowych ryb. Pomiar stężeń substancji odniesienia odbywa się tylko pierwszego i trzeciego dnia wydalania, a dwa następne punkty pobierania próbek dobiera się tak, aby można było dokonać wiarygodnych szacunków stężenia w czasie zerowym ($C_{0,d}$) oraz k_2 w odniesieniu do substancji odniesienia.

W miarę możliwości zawartość lipidów u poszczególnych ryb należy oznaczać przy każdej okazji pobierania próbek lub co najmniej na początku i na końcu fazy wchłaniania oraz na końcu fazy wydalania. (por. pkt 56 i 67). W zależności od stosowanej metody analitycznej (odniesienie do pkt 67 i dodatku 4) możliwe może być wykorzystanie tej samej ryby do wyznaczenia zarówno zawartości lipidów, jak i stężenia substancji badanej. Podejście takie jest preferowane ze względu na minimalizowanie liczby ryb. Jeżeli nie jest to jednak możliwe, można zastosować takie samo podejście, jak opisane w przypadku metody narażenia drogą wodną (zob. pkt 56 w odniesieniu do takich alternatywnych możliwości pomiaru zawartości lipidów). Takie metody stosowane do określenia ilościowego zawartości lipidów należy udokumentować w sprawozdaniu.

Jakość metody analitycznej

Aby zapewnić swoistość, dokładność, precyzję i odtwarzalność specyficznych dla substancji technik analitycznych, a także odzysk badanej substancji zarówno z paszy, jak i z ryb, należy przeprowadzać kontrole doświadczenia.

Pomiar wzrostu ryb

Na początku badania należy zważyć próbkę ryb z populacji (i zmierzyć ich długość całkowitą). Próbki od tych ryb należy pobrać na krótko przed pierwszym podaniem wzbogaconej paszy (np. godzinę wcześniej) i przypisać je do dnia doświadczalnego 0. Liczba ryb wykorzystanych do pobrania tych próbek powinna być co najmniej taka sama, jak liczba wykorzystana do pobrania próbek w trakcie badania. Niektóre z tych ryb mogą być te same, co ryby wykorzystane do analizy lipidów przed rozpoczęciem fazy wchłaniania (por. pkt 153). Podczas każdego okresu pobierania próbek najpierw waży się ryby i mierzy ich długość. Dane dotyczące masy (i długości) każdej ryby należy powiązać ze stężeniem analizowanej substancji chemicznej (i w stosownych przypadkach zawartością lipidów), na przykład przy użyciu indywidualnego kodu identyfikacyjnego w odniesieniu do każdej ryby z próby. Pomiary tych próbek ryb można wykorzystać do oszacowania masy (i długości) ryb pozostających w zbiornikach badawczych i kontrolnych.

Ocena doświadczenia

Należy codziennie prowadzić obserwacje dotyczące upadkowości i odnotowywać je. Należy prowadzić dodatkowe obserwacje dotyczące niekorzystnych skutków, na przykład odnoszące się do nietypowego zachowania lub przebarwienia, i odnotowywać je. Ryby uznaje się za martwe, jeżeli nie występuje ruch oddechowy i nie można wykryć reakcji na niewielką stymulację mechaniczną. Należy usuwać wszystkie martwe ryby lub ryby będące wyraźnie w stanie agonalnym.

▼M7

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

Wyniki badania wykorzystuje się w celu uzyskania wartości stałej szybkości wydalania (k_2) jako funkcji całkowitej mokrej masy ryby. Stałą szybkości wzrostu, k_g, oblicza się na podstawie średniego wzrostu masy ryby i stosuje w stosownych przypadkach do uzyskania stałej szybkości wydalania skorygowanej pod kątem wzrostu, k_{2g}. Ponadto należy odnotowywać wydajność przyswajania (a; absorpcję z jelita), kinetyczny współczynnik biomagnifikacji (BMF_K) (w stosownych przypadkach skorygowany pod kątem wzrostu, BMF_{Kg}), jego wartość skorygowaną pod kątem zawartości lipidów (BMF_{KL} lub BMF_{KgL}, jeżeli jest skorygowany pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu) oraz częstotliwość karmienia. Ponadto jeżeli można oszacować czas do osiągnięcia stanu równowagi w fazie wchłaniania (np. 95 % stanu równowagi lub t_{95} = $3{,}0/k_2$), można włączyć oszacowanie BMF w stanie równowagi (BMF_{SS}) (por. pkt 105 i 106 oraz dodatek 5), jeżeli wartość t_{95} wskazuje na to, że mogły zostać osiągnięte warunki stanu równowagi. Aby uzyskać wartość skorygowaną pod kątem lipidów, tj. BMF_{SSL}, należy stosować w odniesieniu do tego BMF_{SS} tę samą korektę pod kątem zawartości lipidów, co w przypadku kinetycznie uzyskanego BMF (BMF_K) (należy zauważyć, że nie istnieje żadna uznana procedura dokonywania korekty BMF w stanie równowagi pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu). Wzory i przykładowe obliczenia przedstawiono w dodatku 7. Istnieją metody pozwalające na oszacowanie kinetycznego współczynnika biokoncentracji (BCF_K) na podstawie danych uzyskanych w badaniu narażenia drogą pokarmową. Kwestię tę omówiono w dodatku 8.

Dane na temat masy/długości ciała ryb

Dane tabelaryczne dotyczące mokrej masy i długości poszczególnych ryb odnoszące się do wszystkich okresów zestawia się oddzielnie w przypadku grupy badanej i grupy kontrolnej we wszystkich dniach pobierania próbek w trakcie fazy wchłaniania (na początku wchłaniania od ryb z podstawowej populacji; pod koniec wchłaniania od ryb z grupy kontrolnej i z grupy badanej oraz, jeżeli są prowadzone, od grupy kontrolnej i grupy badanej we wczesnej fazie (np. 1–3 dnia wchłaniania) i fazie wydalania (np. 1, 2, 4, 7, 14, 28 dnia). Preferowaną miarą wzrostu na potrzeby korekty pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu jest masa. Zobacz poniżej (pkt 162 i 163) oraz dodatek 5 w odniesieniu do metod(-y) stosowanej(-ych) do korygowania danych pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu.

Dane dotyczące stężenia substancji badanej u ryb

Pomiary pozostałości substancji badanej u poszczególnych ryb (lub w zbiorczych próbkach ryb, jeżeli nie jest możliwe dokonanie pomiarów u poszczególnych ryb), wyrażone w postaci stężenia w mokrej masie (w/w), zestawia się w postaci tabeli w odniesieniu do ryb badanych i ryb kontrolnych dla poszczególnych okresów pobierania próbek. Jeżeli u każdej ryby, od której pobiera się próbki, przeprowadzono analizę lipidów, można uzyskać i podać w formie danych tabelarycznych poszczególne stężenia skorygowane pod kątem zawartości lipidów (w/w lipidów).

— Pomiary pozostałości substancji badanej u poszczególnych ryb (lub w zbiorczych próbkach ryb jeżeli nie jest możliwe dokonanie pomiarów u poszczególnych ryb, por. pkt 66) w odniesieniu do okresu wydalania przekształca się w logarytmy naturalne i wykreśla się na wykresie w stosunku do czasu (dni). Jeżeli kontrola wizualna wykresu wykazuje oczywiste wartości odstające, można zastosować statystycznie ważny test na wartość odstającą w celu usunięcia błędnych punktów danych, a także przedstawić udokumentowane uzasadnienie ich pominięcia.

— Korelację liniową bazującą na metodzie najmniejszych kwadratów oblicza się w oparciu o ln(stężenia) w stosunku do danych dotyczących (dziennego) wydalania. Nachylenie i punkt przecięcia linii są odnotowywane jako ogólna stała szybkości wydalania (k_2) i naturalny logarytm z uzyskanego stężenia w czasie zerowym ($C_{0,d}$) (por. dodatek 5 i dodatek 7 aby uzyskać dodatkowe szczegółowe informacje). Jeżeli nie jest to możliwe ze względu na to, że stężenia przy drugim pobieraniu próbek w okresie wydalania mają wartość poniżej granicy oznaczalności, można zachowawczo oszacować wartość k_2 (por. dodatek 7).

— Wariancje w nachyleniu i punkcie przecięcia linii oblicza się, stosując standardowe procedury statystyczne oraz ocenione i przedstawione 90-procentowe (lub 95-procentowe) przedziały ufności wokół tych wyników.

▼M7

— Mierzone średnie stężenie u ryby w ostatnim dniu wchłaniania (mierzone stężenie w czasie zerowym, $C_{0,m}$) również oblicza się i porównuje z uzyskaną wartością $C_{0,d}$. W przypadku gdy uzyskana wartość jest niższa niż wartość pomiarowa, taka różnica może świadczyć o obecności nieprzetrawionej wzbogaconej paszy w jelicie. Jeżeli uzyskana wartość jest zdecydowanie wyższa niż wartość pomiarowa, może to wskazywać, że wartość uzyskana z regresji liniowej danych z okresu wydalania jest błędna i powinna być ponownie oszacowana (zob. dodatek 7).

Szybkość wydalania i współczynnik biomagnifikacji

Aby obliczyć współczynnik biomagnifikacji z danych, należy najpierw uzyskać wartość wydajności przyswajania (wchłanianie substancji badanej na całej długości jelitaα). W tym celu należy zastosować równanie A7.1 z dodatku 7, do którego muszą być znane wartość uzyskanego stężenia u ryby w czasie zerowym fazy wydalania ($C_{0,d}$), (ogólnej) stałej szybkości wydalania (k_2), stężenia w paszy (C_{pasza}), stałej szybkości trawienia paszy (I) oraz długości okresu wchłaniania (t). Nachylenie i punkt przecięcia zależności liniowej między ln(stężenia) a czasem wydalania są zgłaszane jako ogólna stała szybkości wydalania (k_2 = nachylenie) i stężenie w czasie zerowym ($C_{0,d} = e^{punkt\ przecięcia}$), jak powyżej. Uzyskane wartości należy sprawdzić pod kątem biologicznej wiarygodności (np. wydajność przyswajania jako ułamek nie jest wyższa niż 1). *(I)* oblicza się, dzieląc masę paszy przez masę karmionej codziennie ryby (jeżeli podaje się paszę w ilości 2 % masy ciała, (*I)* będzie wynosić 0,02). Częstotliwość karmienia stosowana w obliczeniach może jednak wymagać dostosowania pod kątem wzrostu ryb (można tego dokonać, stosując znaną stałą szybkości wzrostu do oszacowania masy ryb w każdym punkcie czasu w trakcie fazy wchłaniania; por. dodatek 7). Jeżeli nie jest możliwe ustalenie wartości k_2 i $C_{0,d}$ ze względu na to, że na przykład stężenia przy drugim pobieraniu próbek w okresie wydalania mają wartość poniżej granicy wykrywalności, można zachowawczo oszacować wartość k_2 oraz „górną granicę" BMF_k (por. dodatek 7).

Po ustaleniu wydajności przyswajania (α) współczynnik biomagnifikacji można obliczyć, mnożąc α przez wartość stałej szybkości trawienia (I) oraz dzieląc ją przez (ogólną) stałą szybkości wydalania (k_2). Współczynnik biomagnifikacji skorygowany pod kątem wzrostu oblicza się w ten sam sposób, lecz korzystając ze stałej szybkości wydalania skorygowanej pod kątem wzrostu (k_{2g}; por. pkt 162 i 163. Wydajność przyswajania można oszacować w sposób alternatywny, jeżeli dokonano analizy tkanek u ryb, od których pobrano próbki we wczesnej fazie liniowej fazy wchłaniania; por. pkt 151 i dodatek 7. Wartość ta stanowi niezależny szacunek wydajności przyswajania w odniesieniu do organizmu zasadniczo niepoddanego narażeniu (tj. gdy ryby są na początku fazy wchłaniania). Aby uzyskać BMF wykorzystuje się zazwyczaj wartość wydajności przyswajania oszacowaną z danych dotyczących wydalania.

Korekta pod kątem zawartości lipidów i korekta pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu

Na skutek wzrostu ryb w fazie wydalania mierzone stężenia substancji chemicznej w rybach mogą ulegać zmniejszeniu, w wyniku czego ogólna stała szybkości wydalania (k_2) będzie większa niż wynikałoby to z samych tylko procesów usuwania (np. metabolizmu, wydalania) (por. pkt 72). Zawartość lipidów w rybach doświadczalnych (ściśle związana z bioakumulacją substancji hydrofobowych) i zawartość lipidów w paszy mogą ulegać w praktyce takim zmianom, że niezbędna jest ich korekta w celu przedstawienia współczynników biomagnifikacji w sensowny sposób. Należy dokonać korekty współczynnika biomagnifikacji pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu (tak ja w przypadku kinetycznego BCF w ramach metody narażenia drogą wodną) oraz pod kątem zawartości lipidów w paszy związanej z zawartością u ryb (współczynnik korygujący poziom lipidów). Równania i przykłady obliczeń można znaleźć odpowiednio w dodatku 5 i w dodatku 7.

W celu skorygowania rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu, należy obliczyć stałą szybkości wydalania skorygowaną pod kątem wzrostu (k_{2g}) (równania można znaleźć w dodatku 5). Tę stałą szybkości wydalania skorygowaną pod kątem wzrostu (k_{2g}) stosuje się następnie do obliczenia współczynnika biomagnifikacji skorygowanego pod kątem wzrostu, tak jak wskazano w pkt 73. W pewnych przypadkach taka metoda nie jest możliwa. Alternatywne podejście, które pozwala pominąć potrzebę korekty o rozcieńczenie wynikające ze wzrostu,

▼M7

polega na wykorzystaniu danych dotyczących masy substancji badanej przypadającej na wydalanie pojedynczej ryby (na podstawie całej ryby) zamiast normalnych danych dotyczących masy substancji badanej przypadającej na jednostkę masy ryb (stężenie). Można to łatwo osiągnąć, ponieważ badania według tej metody powinny wiązać zapisane stężenia w tkance z masą ciała poszczególnych ryb. Prostą procedurę umożliwiającą osiągnięcie tego celu przedstawiono w dodatku 5. Należy zwrócić uwagę, że k_2 musi zostać oszacowane i zgłoszone nawet w przypadku stosowania tej alternatywnej metody.

Aby dokonać korekty pod kątem zawartości lipidów w paszy i u ryby, w przypadku gdy nie przeprowadzono analizy zawartości lipidów u wszystkich ryb, od których pobrano próbki, ustala się średnie frakcje lipidowe (w/w) u ryb i w paszy ([1]). Współczynnik korygujący pod kątem lipidów (L_c) oblicza się wtedy, dzieląc średnią frakcję lipidową u ryb przez średnią frakcję lipidową w paszy. Aby obliczyć współczynnik biomagnifikacji skorygowany pod kątem zawartości lipidów, współczynnik biomagnifikacji, w zależności od zastosowania skorygowany pod kątem wzrostu lub nie, dzieli się przez współczynnik korygujący pod kątem zawartości lipidów.

Jeżeli analizę substancji chemicznej i analizę lipidów wykonywano u tej samej ryby i w każdym punkcie pobierania próbek, wówczas można wykorzystać dane dotyczące tkanki danej ryby skorygowane pod kątem zawartości lipidów do bezpośredniego obliczenia BMF skorygowanego pod kątem zawartości lipidów (por. (37)). Na wykresie przedstawiającym dane dotyczące stężenia skorygowanego pod kątem zawartości lipidów podano $C_{0,d}$ na podstawie lipidów oraz k_2. Analizę matematyczną można przeprowadzić, stosując te same równania przedstawione w dodatku 7, lecz wydajność przyswajania (a) oblicza się, stosując stałą szybkości trawienia paszy znormalizowaną pod kątem lipidów (I_{lipidy}) i stężenie w pokarmie na podstawie zawartości lipidów ($C_{\text{pasza-lipidy}}$). Podobnie następnie stosuje się parametry skorygowane pod kątem zawartości lipidów do obliczenia BMF (należy zauważyć, że aby obliczyć BMF skorygowany pod kątem zawartości lipidów i pod kątem wzrostu$_{\text{KgL}}$, należy raczej również zastosować korektę stałej szybkości wzrostu w odniesieniu do frakcji lipidowej, nie zaś mokrą masę ryby).

Interpretacja wyników

Aby można było wykluczyć występowanie efektów toksycznych, średni wzrost zarówno w badanej grupie, jak i w grupie kontrolnej nie powinien się zasadniczo znacząco różnić. Należy porównać stałe szybkości wzrostu lub krzywe wzrostu obu grup, stosując stosowną procedurę ([2]).

Sprawozdanie z badania

Po zakończeniu badania przygotowuje się sprawozdanie końcowe zawierające informacje dotyczące *substancji badanej*, *gatunku doświadczalnego* oraz *warunków badania*, jak ujęto w wykazie w pkt 81 (tak jak w przypadku metody narażenia drogą wodną). Ponadto konieczne są następujące informacje:

Substancja badana:

— wszelkie informacje dotyczące stabilności substancji badanej w przygotowywanej paszy;

([1]) Podejście to dotyczy szczególnie badania narażenia drogą pokarmową i różni się ono od procedury stosowanej w ramach narażenia drogą wodną, stąd aby uniknąć pomyłki, używa się raczej słowa „korekta” zamiast słowa „normalizacja” – zob. również przypis w pkt 106.

([2]) Można wykonać test *t*-Studenta na stałych szybkości wzrostu, aby zbadać, czy istnieje różnica w zakresie wzrostu między grupą kontrolną a grupą badaną, lub test *F* w przypadku analizy wariancji. W razie konieczności można zastosować test *F* lub test ilorazu wiarygodności, które będą pomocne przy wyborze odpowiedniego modelu wzrostu (monografia OECD nr 54, (32)).

▼M7

Warunki badania:

— stężenie nominalne substancji w paszy, technika wzbogacania, ilość nośnika (lipidu) stosowanego w procesie wzbogacania paszy (o ile jest wykorzystany), pomiary stężenia substancji badanej we wzbogaconej paszy w odniesieniu do każdej analizy (co najmniej trzykrotnie przed rozpoczęciem badania i pod koniec wchłaniania) oraz średnie wartości;

— rodzaj i jakość nośnika w postaci oleju lub rozpuszczalnika (czystość, dostawca itp.) stosowane przy wzbogacaniu paszy;

— stosowany rodzaj paszy (przybliżona analiza [1]), czystość lub jakość, dostawca itp.), częstotliwość karmienia podczas fazy wchłaniania, ilość podawanej paszy i częstotliwość podawania (przy uwzględnieniu wszelkich dostosowań opartych na masie ryb, od których pobrano próbki);

— moment, w którym zabrano i uśmiercono ryby na potrzeby analizy substancji chemicznej w odniesieniu do każdego punktu pobierania próbek (np. godzinę przed karmieniem w następnym dniu);

Wyniki:

— wyniki wszelkich wstępnych czynności poprzedzających badanie;

— informacje dotyczące jakichkolwiek zaobserwowanych niekorzystnych skutków;

— pełen opis wszystkich stosowanych procedur analizy substancji chemicznej, w tym granice wykrywalności i oznaczenie ilościowe, zmienność i ustanie działania substancji;

— mierzone stężenia lipidów w paszy (paszy wzbogaconej i paszy dla grupy kontrolnej), poszczególne średnie wartości i odchylenia standardowe;

— zestawione dane tabelaryczne dotyczące masy (i długości) ryb powiązane z poszczególnymi rybami zarówno w odniesieniu do grupy kontrolnej, jak i grupy narażonej na działanie substancji (na przykład przy użyciu indywidualnych identyfikatorów w przypadku każdej ryby) oraz obliczenia, wyprowadzona(-e) stała(-e) szybkości wzrostu i 95-procentowy(-e) przedział(-y) ufności;

— zestawione dane tabelaryczne dotyczące stężenia substancji badanej u ryby, średnie mierzone stężenie pod koniec wchłaniania ($C_{0,m}$) oraz wyznaczona (ogólna) stała szybkości wydalania (k_2) i stężenie substancji u ryby na początku fazy wydalania ($C_{0,d}$) wraz z wariancjami tych wartości (nachyleniem i punktem przecięcia);

— zestawione dane tabelaryczne dotyczące zawartości lipidów u ryby (w stosownych przypadkach wymienione przy konkretnych stężeniach substancji), średnie wartości w odniesieniu do grupy badanej i grupy kontrolnej na początku badania, na końcu wchłaniania i na końcu wydalania;

— krzywe (w tym wszystkie zmierzone dane) wskazujące następujące wartości (w stosownych przypadkach stężenia można wyrazić w odniesieniu do całego ciała zwierzęcia lub jego określonych tkanek):

  — wzrost (tj. masa (i długość) ryby w stosunku do czasu) lub logarytm naturalny zmienionej masy w stosunku do czasu;

[1] Technika analizy paszy pod kątem białka, lipidów, włókna surowego i zawartości popiołu; informacje te zazwyczaj można uzyskać od dostawcy paszy.

▼M7

— wydalanie substancji badanej u ryby; oraz

— logarytm naturalny zmienionego stężenia (ln stężenia) w stosunku do czasu wydalania (w tym wyznaczona stała szybkości wydalania k_2) oraz logarytm naturalny wyznaczonego stężenia na początku fazy wydalania, $C_{0,d}$);

— jeżeli kontrola wizualna wykresu wykazuje oczywiste wartości odstające, można zastosować statystycznie ważny test na wartość odstającą w celu usunięcia błędnych punktów danych, a także przedstawić udokumentowane uzasadnienie ich pominięcia;

— obliczona stała szybkości wydalania skorygowana pod kątem wzrostu i okres półtrwania skorygowany pod kątem wzrostu;

— obliczona wydajność przyswajania (α);

— „nieprzetworzony" pokarmowy BMF, kinetyczny BMF skorygowany pod kątem zawartości lipidów i pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu („nieprzetworzony" i skorygowany pod kątem zawartości lipidów w oparciu o mokrą masę całej ryby), w stosownych przypadkach BMF specyficzny dla tkanek;

— wszelkie informacje dotyczące metabolitów substancji badanych znakowanych izotopem i ich nagromadzenia;

— wszystko, co odbiega od normy, jeżeli chodzi o badanie, wszelkie odchylenia od tych procedur oraz wszelkie inne ważne informacje;

— tabela podsumowująca zawierająca istotne zmierzone i policzone dane, jak przedstawiono poniżej:

Stałe szybkości wydalania substancji oraz współczynniki biomagnifikacji (BMF_K)	
k_g (stała szybkości wzrostu; dzień$^{-1}$):	podać wartość (95 % CI) (1)
k_2 (ogólna stała szybkości wydalania, dzień$^{-1}$):	podać wartość (95 % CI)
k_{2g} (stała szybkości wydalania skorygowana pod kątem wzrostu; dzień$^{-1}$):	podać wartość (95 % CI) (1)
$C_{0,m}$ (zmierzone stężenie w czasie zerowym, stężenie u ryby na koniec wchłaniania) (µg/g):	podać wartość ± SD (2)
$C_{0,d}$ (wyprowadzona wartość stężenia w czasie zerowym fazy wydalania; µg/g):	podać wartość ± SD (2)
I (wyznaczona częstotliwość spożywania pokarmu; g pokarmu / g masy ciała ryby dziennie):	podać wartość
I_g (faktyczna częstotliwość karmienia dostosowana do szybkości wzrostu; g pokarmu / g masy ciała ryby dziennie) (2):	podać wartość ± SD (2)
C_{pasza} (stężenie substancji chemicznej w pokarmie; µg/g):	podać wartość ± SD (2)
α (wydajność przyswajania substancji):	podać wartość ± SD (2)
BMF_K (kinetyczny pokarmowy BMF):	podać wartość (95 % CI) (1)
BMF_{kg} (skorygowany pod kątem wzrostu kinetyczny pokarmowy BMF):	podać wartość (95 % CI) (1)

▼M7

Stałe szybkości wydalania substancji oraz współczynniki biomagnifikacji (BMF_K)	
$t_{1/2g}$ (skorygowany pod kątem wzrostu okres półtrwania w dniach):	podać wartość ± SD ([2])
*L*c (współczynnik korygujący poziom lipidów):	podać wartość
BMF_{KgL} (skorygowany pod kątem lipidów i wzrostu kinetycznego BMF):	podać wartość
$BMF_{SS\text{-}L}$ (orientacyjny BMF w stanie równowagi skorygowany pod kątem lipidów) ([2]):	podać wartość ± SD ([2])

([1]) CI: przedział ufności (jeżeli można go oszacować)
([2]) SD: odchylenie standardowe (jeżeli można je oszacować)

BIBLIOGRAFIA

(1) Chapter C.13 of this Annex, *Bioconcentration: Flow-through Fish Test*.

(2) Chapter A.6 of this Annex, *Water Solubility*

(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) Chapter A.8 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method*.

(5) Chapter A.24 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method*.

(6) Chapter A.23 of this Annex, *Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method.*

(7) Chapter C.7 of this Annex, *Hydrolysis as a Function of 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) Chapter A.5 of this Annex, *Surface Tension of Aqueous Solutions*.

(10) Chapter A.4 of this Annex, *Vapour Pressure.*

(11) Chapter C.4 of this Annex, *Ready Biodegradability.*

(12) Chapter C.29 of this Annex, *Ready Biodegradability – CO_2 in sealed vessels*

(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. Available from: 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. published: 3 April 2012.

(22) Chapter C.47 of this Annex, *Fish, Early-Life Stage Toxicity Test.*

(23) Chapter C.15 of this Annex, *Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages*

(24) Chapter C.14 of this Annex, *Fish, Juvenile Growth Test.*

(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

Dodatek 1

DEFINICJE I JEDNOSTKI

Wydajność przyswajania (α) stanowi miarę względnej ilości substancji przyswajanej przez organizm z jelit (choć wartości α nie wyraża się w żadnych jednostkach, najczęściej przedstawia się ją jako odsetek, a nie jako ułamek).

Bioakumulacja zasadniczo oznacza proces, w ramach którego stężenie substancji w organizmie osiąga poziom przekraczający poziom stężenia substancji w substancji lub mieszaninie wykorzystywanej do celów oddechowych (np. woda w przypadku ryb lub powietrze w przypadku ssaków), w pokarmie lub w obydwu tych nośnikach(1).

Biokoncentracja oznacza wzrost stężenia substancji badanej w danym organizmie lub na nim (lub określonych tkankach tego organizmu) w stosunku do stężenia substancji badanej w ośrodku.

Współczynnik biokoncentracji (BCF lub K_B) w dowolnym momencie fazy wchłaniania w ramach przedmiotowego testu akumulacji odpowiada stężeniu substancji badanej w/na rybach lub ich określonych tkankach (C_f, wyrażone w mg/kg) podzielonemu przez stężenie substancji w ośrodku (C_w, wyrażone w mg/l). BCF wyraża się w $l\ kg^{-1}$. Należy pamiętać o tym, że korekty pod kątem wzrostu lub standardowej zawartości lipidów nie są brane pod uwagę.

Biomagnifikacja oznacza wzrost stężenia substancji badanej w lub na danym organizmie (lub w określonych tkankach tego organizmu) w stosunku do stężenia substancji badanej w pokarmie.

Współczynnik biomagnifikacji (BMF) oznacza stężenie substancji w organizmie drapieżnika w stosunku do stężenia substancji w organizmie ofiary drapieżnika (lub w pokarmie) w stanie równowagi. Zgodnie z metodą opisaną w niniejszej metodzie badawczej dokłada się starań, aby unikać narażenia na działanie substancji w fazie wodnej, dlatego też wartość BMF uzyskana dzięki zastosowaniu niniejszej metody badawczej nie może zostać bezpośrednio porównana z wartością BMF ustaloną w oparciu o wyniki badania w terenie (w ramach którego dopuszcza się możliwość narażenia na działanie substancji zarówno drogą wodną, jak i drogą pokarmową).

Pokarmowy współczynnik biomagnifikacji (pokarmowy BMF) to termin stosowany w ramach niniejszej metody badawczej do opisania wyniku testu narażenia drogą pokarmową, w którym dokłada się starań, aby unikać narażenia na działanie substancji w fazie wodnej, dlatego też wartość BMF uzyskana dzięki zastosowaniu niniejszej metody badawczej nie może zostać bezpośrednio porównana z wartością BMF ustaloną w oparciu o wyniki badania w terenie (w ramach którego dopuszcza się możliwość narażenia na działanie substancji zarówno drogą wodną, jak i drogą pokarmową).

Faza wydalania lub faza po narażeniu na działanie substancji (utraty) to okres następujący po przeniesieniu ryb doświadczalnych z ośrodka zawierającego substancję badaną do ośrodka wolnego od tej substancji, w trakcie którego bada się przebieg procesu wydalania (lub utraty netto) substancji z organizmu ryb doświadczalnych (lub z określonych tkanek tych ryb).

Stała szybkości wydalania (utraty) (k_2) oznacza wartość liczbową określającą szybkość zmniejszania stężenia substancji badanej u ryb doświadczalnych (lub w określonych tkankach tych ryb) po przeniesieniu ryb doświadczalnych z ośrodka zawierającego substancję badaną do ośrodka wolnego od tej substancji (k_2 wyraża się w $dniach^{-1}$).

Rozpuszczalny węgiel organiczny (RWO) to miara stężenia węgla pochodzącego z rozpuszczonych źródeł organicznych w ośrodkach wykorzystywanych w badaniu.

Faza narażenia na działanie substancji lub faza wchłaniania to okres, w którym ryby są narażone na działanie substancji badanej.

Częstotliwość karmienia (I) oznacza średnią ilość pokarmu spożywaną przez każdą rybę każdego dnia w zestawieniu z szacunkową średnią masą całego ciała ryby (wyrażoną w g pokarmu / g masy ciała ryby dziennie).

▼M7

Kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_K) to stosunek stałej szybkości wchłaniania k_1 do stałej szybkości wydalania k_2 (tj. k_1/k_2 – zob. stosowne definicje w niniejszym dodatku). Zasadniczo wartość tego współczynnika powinna być porównywalna z wartością BCF_{SS} (zob. definicja powyżej), ale może dojść do wystąpienia odchyleń w przypadku braku pewności co do stanu równowagi lub w przypadku gdy kinetyczny współczynnik BCF został skorygowany pod kątem wzrostu.

Kinetyczny współczynnik biokoncentracji znormalizowany pod kątem lipidów (BCF_{KL}) został znormalizowany do ryb, u których zawartość lipidów wynosi 5 %.

Kinetyczny współczynnik biokoncentracji znormalizowany pod kątem lipidów i skorygowany pod kątem wzrostu (BCF_{KgL}) został znormalizowany do ryb, u których zawartość lipidów wynosi 5 %, i skorygowany pod kątem wzrostu w okresie badania, jak opisano w dodatku 5.

Znormalizowany pod kątem lipidów współczynnik biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{SSL}) został znormalizowany dla ryb, u których zawartość lipidów wynosi 5 %.

Substancja wieloskładnikowa została zdefiniowana do celów REACH jako substancja zawierająca więcej niż jeden składnik główny w stężeniu mieszczącym się w zakresie od 10 % do 80 % (w/w).

Współczynnik podziału n-oktanol/woda (K_{OW}) to szybkość rozpuszczalności substancji w *n*-oktanolu i wodzie w stanie równowagi (metody A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)); wyrażany również jako P_{OW}. Logarytm K_{OW} wykorzystuje się jako wskaźnik zdolności substancji chemicznej do bycia przedmiotem biokoncentracji przez organizmy wodne.

Węgiel organiczny w postaci cząstek stałych (POC) to miara stężenia węgla pochodzącego ze źródeł organicznych zawieszonych w pożywce.

Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME) to bezrozpuszczalnikowa technika analityczna opracowana z myślą o układach rozcieńczających. W ramach tej metody włókno pokryte polimerem poddaje się działaniu fazy gazowej lub ciekłej zawierającej analit stanowiący przedmiot zainteresowania. Zasadniczo stosuje się minimalny czas analizy, aby osiągnąć równowagę między fazą stałą i płynną u gatunków będących przedmiotem pomiaru. Następnie określa się stężenie analitu będącego przedmiotem zainteresowania bezpośrednio na włóknie lub po pobraniu analitu z włókna i przeniesieniu go do rozpuszczalnika, w zależności od stosowanej techniki oznaczania.

Stan równowagi zostaje osiągnięty na wykresie stężenia substancji badanej u ryb (C_f) w stosunku do czasu, w momencie gdy krzywa zaczyna biec równolegle do osi czasu, a wyniki trzech kolejnych analiz poziomu C_f przeprowadzonych na próbkach pobranych w co najmniej dwudniowych odstępach będą odbiegały od siebie najwyżej o ±20 % oraz między pierwszą a ostatnią analizą nie nastąpi istotny wzrost poziomu C_f. W przypadku próbek zbiorczych należy przeprowadzić co najmniej cztery następujące po sobie analizy. W przypadku substancji badanych o wolnym tempie absorpcji odstępy czasu pomiędzy analizami powinny wynosić odpowiednio siedem dni.

Współczynnik biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{SS}) nie zmienia się w istotnym stopniu w długim okresie, ponieważ stężenie substancji badanej w ośrodku utrzymuje się w tym czasie na stałym poziomie (*por.* definicja stanu równowagi).

Całkowity węgiel organiczny (TOC) to miara stężenia węgla pochodzącego ze wszystkich źródeł organicznych w pożywkach, uwzględniając źródła w postaci cząstek stałych i źródła w postaci cząstek rozpuszczonych.

Stała szybkości wchłaniania (k_1) to wartość liczbowa określająca szybkość wzrostu stężenia substancji badanej w/na rybach doświadczalnych (lub ich określonych tkankach) w przypadku narażenia ryb na działanie danej substancji (k_1 wyraża się w $l\ kg^{-1}$ dzień $^{-1}$).

Substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne określa się jako UVCB.

▼**M7**

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. i Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: s. 624–637

(2) . Rozdział A.8 niniejszego załącznika, *Współczynnik podziału (n-oktanol/woda): metoda wytrząsania w kolbie.*

(3) Rozdział A.24 niniejszego załącznika, *Współczynnik podziału (n-oktanol/woda), metoda HPLC*.

(4) Rozdział A.23 niniejszego załącznika, *Współczynnik podziału (1-oktanol/woda): metoda powolnego mieszania*.

▼M7

Dodatek 2

NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE DOPUSZCZALNEJ WODY ROZCIEŃCZAJĄCEJ

Składnik	Stężenie graniczne
Cząstki stałe	5 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	2 mg/l
Amoniak niejonizowany	1 µg/l
Chlor resztkowy	10 µg/l
Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych	50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli	50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	25 ng/l
Glin	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Miedź	1 µg/l
Żelazo	1 µg/l
Ołów	1 µg/l
Nikiel	1 µg/l
Cynk	1 µg/l
Kadm	100 ng/l
Rtęć	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

▼M7

Dodatek 3

GATUNKI RYB ZALECANE DO BADANIA

Zalecany gatunek	Zalecany zakres temperatur przeprowadzania badania (°C)	Zalecana długość całkowita zwierzęcia doświadczalnego (cm) ([2])
Danio rerio ([1]) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio pręgowany	20 – 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Strzebla wielkogłowa	20 – 25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneusz) Karp	20 – 25	8,0 ± 4,0 ([3])
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck i Schlegel) Ryżanka japońska	20 – 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Cytrynówka	20 – 25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Bass niebieski	20 – 25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Pstrąg tęczowy	13 – 17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linneusz) Ciernik	18 – 20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer *et al.* (1)

([2]) Należy podkreślić, że w trakcie badania za preferowaną miarę wielkości i podstawę dla wyliczania wartości w oparciu o stałą szybkości wzrostu uznaje się masę. Przyjmuje się jednak, że długość stanowi bardziej praktyczną właściwość w przypadku konieczności wzrokowego doboru ryb na początku doświadczenia (tj. doboru z populacji stada).

([3]) Przedstawiony zakres długości został wyznaczony w metodach badawczych stosowanych w odniesieniu do nowych substancji chemicznych itp. w oparciu o japońskie prawo w zakresie kontroli substancji chemicznych (CSCL).

Różne inne gatunki występujące na obszarach przyujściowych i różne inne gatunki morskie są mniej powszechnie wykorzystywane, na przykład:

Spot (*Leiostomus xanthurus*)

Karpieniec zmienny (*Cyprinodon variegatus*)

Menidia berylka (*Menidia beryllina*)

Szumień mały (*Cymatogaster aggregata*)

Jodnica (*Parophrys vetulus*)

Głowacz zbrojny (*Leptocottus armatus*)

Ciernik (*Gasterosteus aculeatus*)

Labraks (*Dicentracus labrax*)

Ukleja (*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Ryby słodkowodne wymienione w tabeli powyżej są łatwe w hodowli lub powszechnie dostępne przez cały rok, natomiast dostępność gatunków morskich i gatunków zamieszkujących obszary przyujściowe jest częściowo ograniczona do terytorium poszczególnych państw. Ryby te nadają się do hodowania i rozmnażania zarówno w gospodarstwach rybackich, jak i w laboratoriach, w warunkach zapewniających im odpowiednią ochronę przed chorobami i pasożytami, co przyczynia się do zagwarantowania odpowiedniego stanu zdrowia danego zwierzęcia doświadczalnego oraz możliwości prześledzenia jego pochodzenia. Wspomniane ryby występują w różnych częściach świata.

BIBLIOGRAFIA

(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

Dodatek 4

HARMONOGRAMY POBIERANIA PRÓBEK NA POTRZEBY BADAŃ NARAŻENIA DROGĄ WODNĄ I POKARMOWĄ

1. **Teoretyczny przykład harmonogramu pobierania próbek na potrzeby pełnego badania biokoncentracji, w ramach którego dochodzi do narażenia na działanie substancji podanej w wodzie przy wartości log K_{OW} = 4.**

Pobieranie próbek ryb	Harmonogram terminów pobierania próbek		Liczba próbek wody (1)	Liczba ryb na próbkę (1)
	Minimalna wymagana częstotliwość (dni) (2)	Dodatkowe pobieranie próbek (dni) (2)		
Faza wchłaniania				
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 wydalania				Należy przenieść ryby do wody wolnej od badanej substancji
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))
OGÓŁEM				40–72 (48 – 80) (5)

(1) Wartości w nawiasach oznaczają liczbę próbek (wody, ryb), które należy pobrać w przypadku przeprowadzania dodatkowego pobierania próbek.

(2) Szacunkowe oznaczenie k_2 dla log K_{OW} z 4,0 przed badaniem wynosi 0,652 dni^{-1}. Łączny czas trwania doświadczenia wynosi 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 dni, tj. 14 dni. Dodatkowe informacje na temat sporządzania szacunków t_{SS} przedstawiono w dodatku 5.

(3) Próbka wody po dostarczeniu co najmniej trzech „objętości komory”.

(4) Próbki tych ryb pobiera się z populacji stada.

(5) W przypadku potrzeby przeprowadzenia bardziej precyzyjnych badań lub badań metabolizmu, które muszą zostać przeprowadzone na większej liczbie ryb, próbki ryb należy pobierać w szczególności pod koniec fazy wchłaniania i wydalania (por. pkt 40).

(6) Co najmniej trzy dodatkowe ryby mogą być potrzebne do celów przeprowadzenia analizy zawartości lipidów w przypadku braku możliwości wykorzystania tych samych ryb, z których pobrano próbki na potrzeby analizy stężeń substancji na początku badania, pod koniec fazy wchłaniania i pod koniec fazy wydalania. Należy zwrócić uwagę na fakt, że w większości przypadków powinno być możliwe przeprowadzenie badania wyłącznie na trzech rybach kontrolnych (por. pkt 56).

▼M7

2. **Teoretyczny przykład harmonogramu pobierania próbek na potrzeby badania bioakumulacji pokarmowej substancji po 10-dniowej fazie wchłaniania i 42-dniowej fazie wydalania.**

Pobranie próbek	Harmonogram terminów pobierania próbek		Liczba próbek pokarmu	Liczb ryb na próbkę	
	Dzień fazy	Dodatkowe próbki ryb?		Grupa badana	Grupa kontrolna
Faza wchłaniania					
1	0	Dopuszczalne (1) (2)	3 – grupa badana	0	5 – 10
			3 – grupa kontrolna (1)		(8 – 13) (2)
1A (3)	1 – 3			5 – 10	5 – 10
2	10	Tak (4)	3 – grupa badana	10 – 15 (4)	5 – 10
			3 – grupa kontrolna (1)	(13 – 18) (5)	(8 – 13) (5)
Faza wydalania					
3	1	Tak (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10
6	7	Tak (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Tak (4)		10 – 15 (4) (13 – 18) (5)	5 – 10 (8 – 13) (5)
OGÓŁEM				59 – 120 (63 – 126) (4) (5)	50 – 110 (56 – 116) (4) (5)

(1) Trzy próbki pokarmu pobrane z grupy kontrolnej i z grupy badanej przeanalizowane pod kątem stężeń substancji badanej oraz pod kątem zawartości lipidów.

(2) Ryby pobiera się z populacji stada możliwie jak najszybciej po rozpoczęciu badania; z co najmniej trzech ryb pobranych z populacji stada na początku badania należy pobrać próbki w celu przeanalizowania ich pod kątem zawartości lipidów.

(3) (Fakultatywne) pobieranie próbek na wczesnym etapie fazy wchłaniania umożliwia zgromadzenie danych niezbędnych do obliczenia szybkości wchłaniania substancji badanej drogą pokarmową, które można porównać z wartością współczynnika wydajności przyswajania obliczonego w oparciu o dane pochodzące z fazy wydalania.

(4) Na potrzeby analizy konkretnej tkanki dopuszcza się możliwość pobrania próbek z pięciu dodatkowych ryb.

(5) Co najmniej trzy dodatkowe ryby mogą być potrzebne do celów przeprowadzenia analizy zawartości lipidów w przypadku braku możliwości wykorzystania tych samych ryb, z których pobrano próbki na potrzeby analizy stężeń substancji na początku badania, pod koniec fazy wchłaniania i pod koniec fazy wydalania. Należy zwrócić uwagę na fakt, że w większości przypadków powinno być możliwe przeprowadzenie badania wyłącznie na trzech rybach kontrolnych (por. pkt 56 i 153).

Uwaga dotycząca czasu trwania poszczególnych faz i terminów pobierania próbek: faza wchłaniania rozpoczyna się w chwili pierwszego podania wzbogaconego pokarmu. Dzień doświadczalny rozpoczyna się w chwili karmienia i kończy się tuż przed kolejnym karmieniem 24 godziny później. Pierwsze pobranie próbek (oznaczone jako „1” w tabeli) powinno nastąpić na krótko przed (np. godzinę przed) pierwszym karmieniem. Pobieranie próbek w trakcie badania najlepiej przeprowadzić tuż przed czasem karmienia przypadającym kolejnego dnia (tj. około 23 godziny po karmieniu przypadającym w dniu pobrania próbek). Faza wchłaniania kończy się tuż przed pierwszym karmieniem niewzbogaconym pokarmem, kiedy to rozpoczyna się faza wydalania (ryby należące do grupy badanej będą prawdopodobnie w dalszym ciągu trawiły wzbogacony pokarm przez 24 godziny od ostatniego karmienia wzbogaconym pokarmem). Oznacza to, że próbkę pobieraną pod koniec fazy wchłaniania należy pobrać tuż przed pierwszym karmieniem niewzbogaconym pokarmem, natomiast pierwszą próbkę pobieraną w fazie wydalania należy pobrać mniej więcej po upływie 23 godzin od czasu pierwszego karmienia niewzbogaconym pokarmem.

▼M7

Dodatek 5

OGÓLNE OBLICZENIA

1. Wprowadzenie

2. Prognoza czasu trwania fazy wchłaniania

3. Prognozowanie czasu trwania fazy wydalania

4. Metoda sekwencyjna: ustalanie wartości stałej szybkości wydalania (utraty) substancji k_2

5. Metoda sekwencyjna: ustalanie stałej szybkości wchłaniania k1 (dotyczy wyłącznie metody narażenia drogą wodną)

6. Metoda równoległego obliczania stałych szybkości wchłaniania i wydalania (utraty) substancji (dotyczy wyłącznie metody narażenia drogą wodną)

7. Korekta wartości kinetycznego BCF i BMF z tytułu rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu

8. Normalizacja lipidów do poziomu 5-procentowej zawartości lipidów(dotyczy wyłącznie metody narażenia drogą wodną)

1. WPROWADZENIE

Ogólny model bioakumulacji substancji podawanej w wodzie u ryb można opisać pod względem procesów wchłaniania i wydalania substancji, pomijając wchłanianie substancji podawanej z pokarmem. Wynik równania różniczkowego (dC_f/dt) opisującego szybkość zmiany wysokości stężenia u ryb (mg kg^{-1} $dzień^{-1}$) uzyskuje się, przeprowadzając następujące działanie (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Równanie A5.1]}$$

gdzie:

k_1 = stała szybkości reakcji pierwszego rzędu przy wchłanianiu substancji przez ryby ($l \cdot kg^{-1}$ $dzień^{-1}$)

k_2 = stała szybkości reakcji pierwszego rzędu przy wydalaniu substancji z ryb ($dzień^{-1}$)

k_g = stała szybkości reakcji pierwszego rzędu dla wzrostu ryb („rozcieńczenie wynikające ze wzrostu") ($dzień^{-1}$)

k_m = stała szybkości reakcji pierwszego rzędu dla przekształceń metabolicznych ($dzień^{-1}$)

k_e = stała szybkości reakcji pierwszego rzędu dla wydalania odchodów ($dzień^{-1}$)

C_w = stężenie w wodzie (mg l^{-1})

C_f = stężenie u ryb (mg kg^{-1} mokrej masy).

W przypadku substancji wykazujących zdolność do bioakumulacji można przyjąć, że średnia ważona czasem (TWA) stanowi najistotniejszy wskaźnik stężenia ekspozycyjnego w wodzie (C_w) w dopuszczalnym zakresie fluktuacyjnym (por. pkt 24). Zaleca się, aby obliczać TWA stężenia substancji w wodzie zgodnie z procedurą przedstawioną metodzie badawczej C.20 w dodatku 6 (2). Należy podkreślić, że przekształcenie logarytmiczne stężenia w wodzie uznaje się za odpowiednie, jeżeli oczekuje się, że między okresami wymiany nastąpi rozpad naturalny, np. w ramach planu badania półstatycznego. W przypadku przepływu dyfuzyjnego przeprowadzenie przekształcenia logarytmicznego w odniesieniu do stężeń ekspozycyjnych może nie być konieczne. Jeżeli TWA stężenia substancji w wodzie zostały wyprowadzone, powinny zostać zgłoszone i być wykorzystywane w późniejszych obliczeniach.

W ramach standardowego badania BCF u ryb fazę wchłaniania i wydalania można opisać w kontekście procesów kinetyki pierwszego rzędu.

▼M7

Szybkość wchłaniania = $k_1 \times C_w$ [Równanie A5.2]

Ogólny wskaźnik utraty = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [Równanie A5.3]

W stanie równowagi, przy założeniu że wzrost i metabolizm są pomijalne (tj. wartości k_g i k_m są praktycznie równe zeru), szybkość wchłaniania jest równa szybkości wydalania, co oznacza, że połączenie równania A5.2 i A5.3 daje następującą zależność:

$$BCF = \frac{C_{f-SS}}{C_{w-SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [Równanie A5.4]

gdzie:

$C_{f\text{-}SS}$ = stężenie u ryb w stanie równowagi (mg kg^{-1} mokrej masy)

$C_{w\text{-}SS}$ = stężenie w wodzie w stanie równowagi (mg l^{-1}).

Stosunek k_1/k_2 określa się jako kinetyczny BCF (BCF_K), którego wartość powinna być równa wartości BCF w stanie równowagi (BCF_{SS}) uzyskanej po podzieleniu stężenia u ryb w stanie równowagi przez stężenie w wodzie w stanie równowagi, przy czym może dojść do wystąpienia odchyleń w przypadku braku pewności co do stanu równowagi lub w przypadku gdy kinetyczny BCF został skorygowany o wzrost. Ponieważ jednak k_1 i k_2 są stałymi, osiągnięcie stanu równowagi nie jest konieczne do wyprowadzenia BCF_K.

W niniejszym dodatku 5 przedstawiono ogólne obliczenia przeprowadzane w oparciu o przywołane równania pierwszego rzędu, których dokonanie jest niezbędne w kontekście metod bioakumulacji w wyniku narażenia drogą wodną i pokarmową. Mimo że informacje zawarte w sekcjach 5, 6 i 8 mają znaczenie wyłącznie dla metody narażenia drogą wodną, zostały przedstawione w niniejszym dodatku, ponieważ są technikami o „ogólnym" charakterze. Dzięki zastosowaniu metod sekwencyjnych (sekcja 4 i 5) i równoległych (sekcja 6) można obliczyć stałe wchłaniania i wydalania wykorzystywane do wyprowadzenia kinetycznych BCF. Sekwencyjna metoda ustalania wartości k_2 (sekcja 4) jest istotna w kontekście metody narażenia drogą pokarmową, ponieważ jej zastosowanie jest konieczne do tego, by obliczyć zarówno wydajność przyswajania, jak i BMF. W dodatku 7 przedstawiono szczegółowe informacje na temat obliczeń specyficznych dla metody narażenia drogą pokarmową.

2. PROGNOZA CZASU TRWANIA FAZY WCHŁANIANIA

Przed przeprowadzeniem badania szacunkową wartość k_2, a stąd odsetek czasu wymaganego do osiągnięcia stanu równowagi, można wyprowadzić z zależności empirycznych między k_2 a współczynnikiem podziału *n*-oktanol/woda (K_{OW}) lub między k_1 a BCF. Należy jednak pamiętać o tym, że równania przedstawione w tej sekcji stosuje się wyłącznie w przypadku, gdy faza wchłaniania i wydalania przebiegają według kinetyki pierwszego rzędu. W przypadku wystąpienia oczywistych przesłanek świadczących o tym, że wspomniane fazy nie przebiegają według kinetyki pierwszego rzędu, i w przypadku chęci uzyskania prognoz dotyczących przebiegu fazy wchłaniania zaleca się zasięgnąć porady specjalisty ds. biostatystyki lub farmakokinetyki.

Szacunkową wartość k_2 (dzień $^{-1}$) można uzyskać, stosując szereg metod. Na przykład w pierwszej kolejności można oprzeć się na następujących zależnościach empirycznych ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 log K_{OW}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3); Równanie A5.5]

lub

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [Równanie A5.6]

gdzie $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (w przypadku substancji, dla których $\log K_{OW} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$) [(4); Równanie A5.7]

([1]) Podobnie jak ma to miejsce w przypadku wszystkich zależności empirycznych, należy upewnić się, że substancja badana wchodzi w zakres dziedziny zastosowania odpowiedniej zależności.

▼M7

oraz $BCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2 = 0,90) [(5); Równanie A5.8]

W = średnia masa ryb poddanych działaniu substancji chemicznej (w gramach mokrej masy) pod koniec fazy wchłaniania / na początku fazy wydalania ([1])

Aby zapoznać się z informacjami na temat innych powiązanych zależności, *zob.* (6). Zastosowanie bardziej złożonych modeli przy szacowaniu wartości k_2 może okazać się korzystne, jeżeli np. istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia istotnych zmian o charakterze metabolicznym (7) (8). W miarę zwiększania się złożoności modelu należy jednak zachowywać coraz większą ostrożność przy interpretowaniu uzyskiwanych prognoz. Na przykład obecność grup nitrowych może świadczyć o szybkim metabolizmie, ale nie w każdym przypadku tak będzie. Dlatego też przy sporządzaniu harmonogramu badania należy zestawić wyniki uzyskane po zastosowaniu metody predykcyjnej z informacjami na temat struktury danej substancji chemicznej oraz z wszelkimi innymi istotnymi informacjami (na przykład z wynikami badań wstępnych).

Czas potrzebny do osiągnięcia określonego odsetka stanu równowagi można obliczyć, stosując szacunkową wartość k_2 wyprowadzoną z ogólnego równania kinetycznego opisującego fazę wchłaniania i wydalania (kinetyka pierwszego rzędu), przy założeniu, że wzrost i metabolizm są pomijalne. Jeżeli w trakcie badania odnotowany zostanie istotny wzrost, opisane poniżej szacunki nie będą wiarygodne. W takich przypadkach zaleca się skorzystanie z wartości k_{2g} skorygowanej pod kątem wzrostu, jak opisano dalej (zob. sekcja 7 niniejszego dodatku):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[Równanie A5.9]}$$

lub, jeżeli wartość C_w jest stała:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Równanie A5.10]}$$

W miarę zbliżania się do stanu równowagi ($t \rightarrow \infty$) wynik równania A5.10 można obniżyć (*por.* (9)(10)) do:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[Równanie A5.11]}$$

lub

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[Równanie A5.12]}$$

W takim przypadku wynik równania BCF x C_w odpowiada przybliżonemu stężeniu substancji u ryb w stanie równowagi ($C_{f\text{-}SS}$). [Uwaga: takie samo podejście można zastosować przy szacowaniu BMF w stanie równowagi w badaniu narażenia drogą pokarmową. W takim przypadku w przywołanych powyżej równaniach BCF zastępuje się BMF, a C_w zastępuje się C_{pasza}, tj. stężeniem substancji w pokarmie]

Równanie A5.10 można rozpisać jako:

$$C_f = C_{f-SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Równanie A5.13]}$$

lub

$$\frac{C_f}{C_{f-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Równanie A5.14]}$$

Na podstawie równania A5.14 można przewidzieć czas potrzebny do osiągnięcia określonego odsetka stanu równowagi, jeżeli wartość k_2 została wcześniej oszacowana na podstawie równania A5.5 lub A5.6.

Zasadniczo za optymalny pod względem statystycznym czas trwania fazy wchłaniania, który pozwoli uzyskać dane nadające się do celów statystycznych (BCF_K), uznaje się okres wymagany do tego, aby krzywa logarytmu na wykresie stężenia substancji badanej u ryb do osi czasu osiągnęła wartość

([1]) Masę ryb pod koniec fazy wchłaniania można oszacować w oparciu o dane zgromadzone w trakcie wcześniejszych badań lub w oparciu o wiedzę na temat gatunku doświadczalnego, na podstawie której można będzie uznać, że masa zwierząt prawdopodobnie zwiększy się w ciągu typowego czasu przeprowadzania badania (np. 28 dni).

▼M7

wynoszącą co najmniej 50 % stanu równowagi (tj. 0,69/k_2), ale nie więcej niż 95 % stanu równowagi (tj. 3,0/k_2) (11). W przypadku gdy akumulacja przekroczy 95 % stanu równowagi, można rozważyć możliwość obliczenia BCF_{SS}.

Czas potrzebny do osiągnięcia 80 % stanu równowagi wynosi (w oparciu o równanie A5.14):

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Równanie A5.15]}$$

lub

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2} \qquad \text{[Równanie A5.16]}$$

Czas potrzebny do osiągnięcia 95 % stanu równowagi wynosi:

$$t_{95} = \frac{-ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2} \qquad \text{[Równanie A5.17]}$$

Na przykład czas trwania fazy wchłaniania (tj. czas potrzebny do tego, by osiągnąć określony odsetek stanu równowagi, np. t_{80} lub t_{95}) dla substancji badanej, w przypadku której log K_{OW} = 4, wynosiłby (w oparciu o równania A5.5, A5.16 i A5.17):

$$logk_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0{,}652 \text{ dnia}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45\ dnia(59godz.)$$

$$\text{lub } t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60\ dnia(110godz.)$$

Alternatywnie, wyrażenie:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31\ (godz.) \qquad \text{[Równanie A5.18]}$$

można wykorzystać do obliczenia czasu potrzebnego do skutecznego osiągnięcia stanu równowagi (t_{eSS}) (12). Dla substancji badanej, w przypadku której K_{OW} = 4, równanie to przyjmuje postać:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121\ godz.$$

3. PROGNOZOWANIE CZASU TRWANIA FAZY WYDALANIA

Prognozowany czas konieczny do zmniejszenia skażenia organizmu do określonej wartości procentowej wyjściowego stężenia można również obliczyć za pomocą ogólnego równania opisującego proces wchłaniania i wydalania (przy założeniu, że dana reakcja przebiega według kinetyki pierwszego rzędu, por. równanie A5.9 (1) (13)).

W przypadku fazy wydalania przyjmuje się, że wartość C_w (lub C_{pasza} w przypadku badania narażenia drogą pokarmową) wynosi zero. Dzięki temu równanie można następnie uprościć do następującej postaci:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[Równanie A5.19]}$$

lub

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[Równanie A5.20]}$$

gdzie $C_{f,0}$ odpowiada stężeniu na początku okresu wydalania.

W takim przypadku 50-procentowy poziom wydalenia zostanie osiągnięty w czasie (t_{50}):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

lub

$$t_{50} = \frac{-ln\,(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Podobnie 95-procentowy poziom wydalania zostanie osiągnięty w czasie:

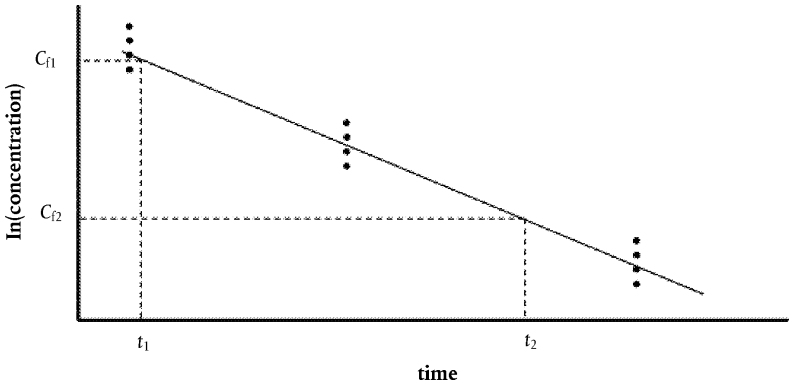
$$t_{95} = \frac{-ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Jeżeli w pierwszym okresie przyjęto 80-procentowy poziom wchłaniania ($1{,}6/k_2$), a poziom utraty substancji w fazie wydalania wynosił 95 % ($3{,}0/k_2$), oznacza to, że faza wydalania trwa w przybliżeniu dwukrotnie dłużej niż faza wchłaniania.

Należy zwrócić uwagę na fakt, że szacunki sporządza się w oparciu o założenie, iż proces wchłaniania i wydalania przebiega według kinetyki pierwszego rzędu. Jeżeli dana reakcja w oczywisty sposób nie będzie przebiegała zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu, przywołane powyżej szacunki nie będą wiarygodne.

4. METODA SEKWENCYJNA: USTALANIE WARTOŚCI STAŁEJ SZYBKOŚCI WYDALANIA (UTRATY) SUBSTANCJI K_2

Uznano, że większość danych dotyczących biokoncentracji została „wystarczająco” dobrze opisana za pomocą prostego modelu dwukomorowego o dwóch parametrach, o czym świadczy fakt, że krzywa prostoliniowa (wykreślona w skali logarytmicznej) zbliża się do punktów oznaczających stężenia u ryb w trakcie fazy wydalania.



Należy zwrócić uwagę na fakt, że odchylenia od linii prostej mogą świadczyć o tym, że schemat wydalania jest w danym przypadku bardziej złożony, niż schemat wydalania przebiegającego według kinetyki pierwszego rzędu. Aby skorygować odnotowywane w fazie wydalania wyniki odbiegające od wyników, jakie uzyskano by, gdyby reakcja przebiegała według kinetyki pierwszego rzędu, można zastosować metodę graficzną.

Aby obliczyć wartość k_2 dla szeregu punktów (pobierania próbek), należy wykreślić regresję liniową ln(stężenie) w stosunku do czasu. Nachylenie linii regresji odpowiada szacunkowej wartości stałej szybkości wydalania k_2 ([1]). Od punktu przecięcia średnie stężenie substancji u ryb na początku fazy wydalania ($C_{0,d}$; parametr ten odpowiada średniemu stężeniu substancji ryb pod koniec fazy wchłaniania) można łatwo obliczyć w następujący sposób (uwzględniając marginesy błędu) ([1]):

([1]) Większość programów, które zapewniają możliwość skorzystania z regresji liniowej, generuje również informacje na temat odchyleń standardowych i przedziałów ufności (CI) reszt – dotyczy to np. programu Microsoft Excel z zainstalowanym zestawem narzędzi do analizy danych.

▼M7

$$C_{0,\ d} = e^{punkt\ przecięcia} \qquad \text{[Równanie A5.21]}$$

Aby obliczyć wartość k_2 w oparciu o zaledwie dwa punkty (pobierania próbek) (podobnie jak ma to miejsce w przypadku planu zminimalizowanego), oba średnie stężenia należy podstawić do następującego równania

$$k_2 = \frac{\ln\left(C_{fl}\right) - \ln\left(C_{f2}\right)}{t_2 - t_1} \qquad \text{[Równanie A5.22]}$$

gdzie $\ln(C_{f1})$ i $\ln(C_{f2})$ stanowią logarytmy naturalne stężeń odpowiednio w czasie t_1 i t_2, a t_2 i t_1 odpowiadają momentom pobrania obu próbek relatywnie do chwili rozpoczęcia wydalania ([1]).

5. METODA SEKWENCYJNA: USTALANIE STAŁEJ SZYBKOŚCI WCHŁANIANIA K_1 (DOTYCZY WYŁĄCZNIE METODY NARAŻENIA DROGĄ WODNĄ)

Aby ustalić wartość k_1 w oparciu o zbiór danych sekwencyjnych dotyczących wysokości stężenia w miarę upływu czasu w fazie wchłaniania, należy skorzystać z programu komputerowego zapewniającego możliwość wyliczenia następującego równania:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \qquad \text{[Równanie A5.23]}$$

gdzie wartość k_2 odpowiada wartości ustalonej w poprzednim równaniu, a wartość C_f (t) i C_w (t) odpowiada – odpowiednio – stężeniu substancji u ryb i w wodzie w czasie t.

Aby obliczyć wartość k_1 w oparciu o zaledwie dwa punkty (pobierania próbek) (podobnie jak ma to miejsce w przypadku planu zminimalizowanego), należy skorzystać z następującego wzoru:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w\left(1 - e^{-k_2 t}\right)} \qquad \text{[Równanie A5.24]}$$

Gdzie wartość k_2 odpowiada wartości ustalonej w poprzednim równaniu, C_f odpowiada stężeniu u ryb na początku fazy wydalania, a C_w odpowiada średniemu stężeniu w wodzie w fazie wchłaniania ([2]).

Zgodność można ocenić metodą wzrokową, analizując nachylenie linii k_1 i k_2 wykreślonych w stosunku do zmierzonych danych dotyczących momentu pobierania próbek. Jeżeli okaże się, że szacunkowa wartość k_1 uzyskana w rezultacie zastosowania metody sekwencyjnej jest niedostatecznie precyzyjna, należy zastosować podejście równoległe w celu obliczenia wartości k_1 i k_2 (zob. sekcja 6 poniżej). Również w tym przypadku należy porównać nachylenie wykreślonych linii w stosunku do zmierzonych danych, aby ocenić stopień zgodności metodą wzrokową. Jeżeli zgodność będzie w dalszym ciągu niezadowalająca, może to świadczyć o tym, że dana reakcja nie przebiega według kinetyki pierwszego rzędu, co wiązałoby się z koniecznością zastosowania bardziej złożonych modeli.

6. METODA RÓWNOLEGŁEGO OBLICZANIA STAŁYCH SZYBKOŚCI WCHŁANIANIA I WYDALANIA (UTRATY) SUBSTANCJI (DOTYCZY WYŁĄCZNIE METODY NARAŻENIA DROGĄ WODNĄ)

Dopuszcza się możliwość skorzystania z programów komputerowych, aby obliczyć wartości k_1 i k_2 przy danym zbiorze danych dotyczących wysokości stężenia w miarę upływu czasu oraz za pomocą następującego modelu:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[Równanie A5.25]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot \left(e^{-k_2(t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \qquad t > t_c \qquad \text{[Równanie A5.26]}$$

gdzie:

t_c = czas pod koniec fazy wchłaniania.

Zastosowanie tego podejścia pozwala bezpośrednio ustalić poziom odchyleń standardowych reszt dla k_1 i k_2. Po zastąpieniu k_1/k_2 BCF (por. równanie A5.4) w równaniu A5.25 i A5.26 można oszacować również poziom odchylenia standardowego i wartość 95 % CI BCF. Jest to szczególnie przydatne

([1]) W odróżnieniu od metody regresji liniowej skorzystanie z tego wzoru nie doprowadzi do wygenerowania odchylenia standardowego dla k2.

([2]) W odróżnieniu od procedury najlepszego dopasowania liniowego ta metoda zazwyczaj nie doprowadzi do wygenerowania odchylenia standardowego ani przedziałów ufności reszt k1.

▼M7

przy porównywaniu różnych szacunków uzyskanych w rezultacie transformacji danych. Zmienną zależną (stężenie substancji u ryb) można dopasować przy zastosowaniu transformacji logarytmicznej lub bez stosowania takiej transformacji, po czym można ocenić niepewność pomiaru uzyskanej wartości BCF.

Ponieważ między obydwoma parametrami k_1 i k_2 istnieje silna korelacja, jeżeli szacuje się je równolegle, zaleca się, aby w pierwszej kolejności obliczyć wartość k_2, opierając się wyłącznie na danych zgromadzonych na etapie wydalania (zob. powyżej); wartość k_2 można w większości przypadków wyprowadzić ze stosunkowo wysokim poziomem precyzji z krzywej wydalania. Wartość k_1 można następnie obliczyć za pomocą regresji nieliniowej w oparciu o dane dotyczące wchłaniania ([1]). Przy dopasowywaniu odpowiednich wartości w ramach metody sekwencyjnej zaleca się korzystanie z tej samej transformacji danych.

Zgodność można ocenić metodą wzrokową, analizując nachylenie linii wykreślonych w stosunku do zmierzonych danych dotyczących momentu pobierania próbek. Jeżeli okaże się, że szacunkowa wartość k_1 uzyskana w rezultacie zastosowania niniejszej metody jest niedostatecznie precyzyjna, można rozważyć możliwość zastosowania podejścia równoległego w celu obliczenia wartości k_1 i k_2. Również w tym przypadku dopasowywany model należy zestawić ze zmierzonymi danymi naniesionymi na wykres w celu ocenienia ich zgodności metodą wzrokową, a uzyskane szacunkowe parametry związane z k_1, k_2 oraz uzyskaną wartość BCF i standardowe odchylenia lub przedziały ufności należy porównać z ich odpowiednikami wyliczonymi w ramach innych rodzajów dopasowania.

Jeżeli zgodność będzie niezadowalająca, może to świadczyć o tym, że dana reakcja nie przebiega według kinetyki pierwszego rzędu, co wiązałoby się z koniecznością zastosowania bardziej złożonych modeli. Wzrost ryb w trakcie badania stanowi jedną z najczęstszych przyczyn występowania komplikacji.

7. KOREKTA WARTOŚCI KINETYCZNEGO BCF I BMF Z TYTUŁU ROZCIEŃCZENIA WYNIKAJĄCEGO ZE WZROSTU

W niniejszej sekcji opisano standardową metodę korygowania wartości o wzrost ryb w trakcie badania (tzw. „rozcieńczenie wynikające ze wzrostu”), którą można stosować wyłącznie w przypadku, gdy dana reakcja przebiega według kinetyki pierwszego rzędu. Jeżeli istnieją przesłanki świadczące o tym, że dana reakcja nie przebiega według kinetyki pierwszego rzędu, zaleca się, aby zasięgnąć porady specjalisty ds. biostatystyki, który wskaże odpowiedni poziom korekty z tytułu rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu, lub aby zastosować opisane poniżej podejście bazujące na masie.

W niektórych przypadkach opisana metoda korygowania wartości z tytułu rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu okazuje się mało precyzyjna lub nieskuteczna (np. w przypadku stosowania substancji badanych o bardzo niskiej szybkości wydalania w odniesieniu do ryb o dużej szybkości wzrostu wartość wyprowadzonej stałej szybkości wydalania skorygowanej z tytułu rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu, tj. k_{2g}, może być bardzo niska, przez co błąd odnotowywany w odniesieniu do obu stałych szybkości wzrostu, na podstawie których wyprowadzono tę wartość, osiągnie poziom krytyczny; ponadto w niektórych przypadkach szacunkowa wartość k_g będzie wyższa niż wartość k_2). W takich przypadkach można zastosować podejście alternatywne (tj. podejście bazujące na masie), które pozwala uniknąć konieczności dokonania korekty i które jest skuteczne również w sytuacji, gdy dana reakcja nie przebiega zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu. Podejście to zostało opisane w końcowej części niniejszej sekcji.

Metoda odejmowania stałej szybkości wzrostu do celów przeprowadzenia korekty z tytułu wzrostu

W ramach standardowej metody wszystkie dane dotyczące masy i długości poszczególnych osobników przekształca się w logarytmy naturalne, a wartość ln(masa) lub ln(1/masa) wykreśla się na wykresie w stosunku do czasu (dni), odrębnie dla grupy badanej i grupy kontrolnej. Tę samą procedurę stosuje się w odniesieniu do danych zgromadzonych odrębnie w trakcie fazy wchłaniania i wydalania. Ogólnie rzecz biorąc, na potrzeby korekty z tytułu rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu zaleca się stosowanie danych dotyczących masy

([1]) Należy pamiętać o tym, że niepewność pomiaru szacunkowej wartości k2 nie jest wykorzystywana we właściwy sposób w ramach modelu bioakumulacji, jeżeli k2 traktuje się jako stałą przy dopasowywaniu k1 w ramach metody dopasowania sekwencyjnego. Dlatego też niepewność pomiaru uzyskanej wartości BCF będzie różna dla metody dopasowania równoległego i sekwencyjnego.

▼M7

zgromadzonych w trakcie całego badania w celu wyprowadzenia stałej szybkości wzrostu (k_g), ale występowanie statystycznie istotnych różnic między stałymi szybkości wzrostu wyprowadzonymi w fazie wchłaniania i w fazie wydalania może świadczyć o tym, że powinno się zastosować stałą szybkości wzrostu w fazie wydalania. Ogólne wartości szybkości wzrostu w badaniach narażenia na działanie substancji w wodzie odnotowywane w grupach badanych i grupach kontrolnych mogą zostać wykorzystane w ramach oceny pod kątem występowania jakichkolwiek skutków związanych z poddaniem działaniu substancji chemicznej.

Stosując standardowe procedury statystyczne, należy obliczyć korelację liniową bazującą na metodzie najmniejszych kwadratów w oparciu o ln (masa ryb) na dzień (a także dla ln (1/masa) na dzień) dla każdej grupy (grupy badane i kontrolne, dane dotyczące poszczególnych zwierząt, a nie średnie wartości dzienne) w ramach całego badania, a także dla fazy wchłaniania i wydalania. Należy obliczyć wariancje w nachyleniu linii i wykorzystać uzyskane wyniki do ocenienia istotności statystycznej (p = 0,05) różnicy w nachyleniach (stałe szybkości wzrostu), stosując test t-Studenta (lub analizę ANOVA w przypadku badania z wykorzystaniem więcej niż jednego stężenia). Korektę z tytułu wzrostu przeprowadza się zazwyczaj w oparciu o dane na temat masy. Dane na temat długości, które przetwarza się w taki sam sposób, mogą okazać się pomocne przy porównywaniu grup kontrolnych i grup badanych pod kątem skutków powiązanych z poddaniem działaniu substancji chemicznej. Jeżeli analiza danych na temat masy nie wykaże występowania statystycznie istotnych różnic, dane zgromadzone w trakcie badania i kontroli można połączyć, ustalając ogólną stałą szybkości wzrostu ryb (k_g) jako równoważną ogólnemu nachyleniu korelacji liniowej. W przypadku odnotowania statystycznie istotnych różnic, stałe szybkości wzrostu dla poszczególnych grup ryb lub etapów badania zgłasza się odrębnie. Stałą szybkości ustaloną dla każdej grupy poddanej działaniu substancji chemicznej należy następnie wykorzystywać przy dokonywaniu korekty z tytułu rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu w danej grupie. W przypadku odnotowania różnic statystycznych między stałymi szybkości w fazie wchłaniania i w fazie wydalania, należy skorzystać ze stałych szybkości wzrostu wyprowadzonych dla fazy wydalania.

Obliczoną stałą szybkości wzrostu (k_g mierzoną w dniach^{-1}) można odjąć od ogólnej stałej szybkości wydalania (k_2), aby uzyskać stałą szybkości wydalania k_{2g}.

$$k_{2\ g} = k_2 - k_g \qquad \text{[Równanie A5.27]}$$

Stałą szybkości wchłaniania dzieli się przez stałą szybkości wydalania skorygowaną pod kątem wzrostu, aby uzyskać kinetyczny BCF skorygowany pod kątem wzrostu, który oznacza się jako BCF_{Kg} (lub BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[Równanie A5.28]}$$

Stałą szybkości wzrostu wyprowadzoną na potrzeby badania narażenia drogą pokarmową wykorzystuje się w równaniu A7.5, aby obliczyć wartość BMF_{Kg} skorygowaną pod kątem wzrostu (por. dodatek 7).

Metoda korekty z tytułu wzrostu bazująca na masie

Jako rozwiązanie alternatywne wobec opisanej powyżej „metody odejmowania stałej szybkości wzrostu” można rozważyć możliwość zastosowania metody bazującej na masie, w ramach której dokonanie korekty z tytułu wzrostu nie jest konieczne. Zgodnie z główną zasadą stosowaną w ramach tej metody dane zgromadzone na etapie wydalania wykorzystuje się w ujęciu masowym na daną rybę, a nie w oparciu o poziom stężenia substancji.

W tym celu należy przekształcić stężenia w tkankach w fazie wydalania (masa substancji badanej / masę jednostkową ryby) w masę substancji badanej u ryby: należy dopasować stężenia i masę ciała poszczególnych ryb w postaci tabeli (np. korzystając z komputerowego arkusza kalkulacyjnego) i przemnożyć każde stężenie przez całkowitą masę ryb w ramach danego pomiaru, aby uzyskać zbiór danych dotyczących stosunku masy substancji badanej do masy ryb dla wszystkich próbek pobranych w fazie wydalania.

Następnie należy wykreślić krzywą logarytmu naturalnego masy substancji do czasu w ramach doświadczenia (faza wydalania) podobnie jak ma to miejsce w przypadku zastosowania standardowej metody.

▼M7

W przypadku metody narażenia drogą wodną należy okresowo wyprowadzać stałą szybkości wchłaniania (zob. sekcje 4 i 6), pamiętając o tym, że w równaniach służących dopasowaniu krzywej do wartości k_1 należy stosować „standardową" wartość k_2, i wyprowadzić stałą szybkości wydalania z powyższych danych. Biorąc pod uwagę fakt, że uzyskana w ten sposób wartość stałej szybkości wydalania jest niezależna od wzrostu, ponieważ została wyprowadzona w oparciu o masę całej ryby, należy oznaczyć ją jako k_{2g}, a nie jako k_2.

8. NORMALIZACJA LIPIDÓW DO POZIOMU 5-PROCENTOWEJ ZAWARTOŚCI LIPIDÓW (DOTYCZY WYŁĄCZNIE METODY NARAŻENIA DROGĄ WODNĄ)

Poziom BCF (kinetycznego i w stanie równowagi) odnotowany w badaniach narażenia drogą wodną należy również zgłosić, zestawiając go z domyślną zawartością lipidów u ryb, która wynosi 5 % mokrej masy, chyba że istnieją podstawy, by sądzić, że substancja badana nie gromadzi się głównie w lipidach (np. niektóre substancje perfluorowane mogą wiązać się z białkami). Dane dotyczące stężenia u ryb lub BCF należy przekształcić we wskaźnik stężenia w mokrej masie przy założeniu 5-procentowej zawartości lipidów. Jeżeli przy dokonywaniu pomiarów stężeń substancji i zawartości lipidów we wszystkich punktach pobierania próbek wykorzystywano te same ryby, każde zmierzone stężenie substancji u danej ryby musi zostać skorygowane o zawartość lipidów u tej ryby.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[Równanie A5.29]}$$

gdzie:

$C_{f,L}$ = stężenie u ryb przy znormalizowanym poziomie lipidów (mg kg^{-1} mokrej masy)

L = frakcja lipidowa (w oparciu o mokrą masę)

C_f = stężenie substancji badanej u ryb (mg kg^{-1} mokrej masy)

Jeżeli nie wszystkie ryby, z których pobrano próbki, zostały poddane analizie lipidów, do znormalizowania BCF wykorzystuje się średnią wartość lipidów. W przypadku BCF w stanie równowagi należy wykorzystać średnią wartość odnotowaną w grupie badanej pod koniec fazy wchłaniania. W kontekście normalizacji kinetycznego BCF mogą pojawić się przypadki, w których zasadne będzie zastosowanie innego podejścia, np. jeżeli odnotowano istotną zmianę zawartości lipidów w trakcie fazy wchłaniania lub wydalania. Jednak niezależnie od przypadku należy rutynowo wyznaczać częstotliwość karmienia w taki sposób, aby ograniczyć możliwość wystąpienia znacznych zmian w zawartości lipidów do minimum.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[Równanie A5.30]}$$

gdzie:

BCF_{KL} = kinetyczny BCF znormalizowany pod kątem zawartości lipidów (L kg^{-1})

L_n = średnia frakcja lipidowa (w oparciu o mokrą masę)

BCF_K = kinetyczny BCF (L kg^{-1})

BIBLIOGRAFIA

(1) Arnot J.A. i Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: s. 2343–2355.

(2) Chapter C.20 of this Annex, *Daphnia magna Reproduction Test*.

(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

Dodatek 6

SEKCJA POŚWIĘCONA RÓWNANIOM WYKORZYSTYWANYM W KONTEKŚCIE BADANIA NARAŻENIA DROGĄ WODNĄ: PLAN BADANIA ZMINIMALIZOWANEGO

Uzasadnieniem takiego podejścia jest to, że współczynnik biokoncentracji w pełnym badaniu można wyznaczyć albo jako współczynnik biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{SS}), obliczając stosunek stężenia substancji badanej w tkance ryby do stężenia substancji badanej w wodzie, albo obliczając kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_K) jako stosunek stałej szybkości wchłaniania k_1 do stałej szybkości wydalania k_2. BCF_K jest ważny, nawet jeżeli nie osiągnięto stężenia substancji w stanie równowagi w fazie wchłaniania, pod warunkiem że proces wchłaniania i wydalania przebiega według kinetyki pierwszego rzędu.

Jeżeli pomiaru stężenia substancji w tkankach (C_{f1}) dokonano w chwili zakończenia okresu narażenia na działanie substancji (t_1), po czym poziom stężenia w tkance (C_{f2}) zmierzono ponownie po upływie pewnego czasu (t_2), stałą szybkości wydalania (k_2) można oszacować, korzystając z równania A5.22 w dodatku 5.

Wartość stałej szybkości wchłaniania, k_1, można następnie obliczyć algebraicznie, stosując równanie A5.23 przedstawione w dodatku 5 (gdzie C_f odpowiada C_{f1}, a t odpowiada t_1)(1). Kinetyczny współczynnik biokoncentracji w ramach planu minimalnego (oznaczony jako BCF_{Km} w celu odróżnienia go od kinetycznych współczynników biokoncentracji wyznaczonych za pomocą innych metod) jest zatem równy:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Równanie A6.1]}$$

Stężenia lub wyniki należy skorygować pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu i znormalizować do ryb o 5-procentowej zawartości lipidów, jak opisano w dodatku 5.

Zminimalizowany BCF_{SS} odpowiada BCF obliczonemu po zakończeniu fazy wchłaniania przy założeniu, że osiągnięto stan równowagi. Ponieważ liczba punktów pobierania próbek nie będzie wystarczająca do tego, by udowodnić osiągnięcie stanu równowagi, konieczne będzie przyjęcie założenia, że stan równowagi został osiągnięty.

$$\text{zminimalizowanyBCF}_{SS} = \frac{C_{f-minSS}}{C_{w-minSS}} \qquad \text{[Równanie A6.2]}$$

gdzie:

$C_{f\text{-}minSS}$ = stężenie u ryb w chwili zakładanego osiągnięcia stanu równowagi pod koniec wchłaniania (mg na kg^{-1} mokrej masy).

$C_{w\text{-}minSS}$ = Stężenie w wodzie w chwili zakładanego osiągnięcia stanu równowagi pod koniec wchłaniania (mg l^{-1}).

BIBLIOGRAFIA

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. i Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: s. 2271–2280.

▼M7

Dodatek 7

SEKCJA POŚWIĘCONA RÓWNANIOM WYKORZYSTYWANYM DO BADANIA NARAŻENIA DROGĄ POKARMOWĄ

1. Przykładowe ilości składników w odpowiednich paszach dla ryb wprowadzonych do obrotu
2. Przykłady technik wzbogacania paszy
3. Obliczanie wydajności przyswajania i współczynnika biomagnifikacji
4. Korekta pod kątem zawartości lipidów
5. Ocena różnic między zmierzonym stężeniem w czasie zerowym (C0,m) a wyprowadzonym stężeniem w *czasie* zerowym (*C*0,d)
6. Wskazówki dotyczące substancji badanych podlegających bardzo szybkiemu wydaleniu

1. PRZYKŁADOWE ILOŚCI SKŁADNIKÓW W ODPOWIEDNICH PASZACH DLA RYB WPROWADZONYCH DO OBROTU

Główny składnik	mączka rybna
Białko surowe	≤ 55,0 %
Tłuszcz surowy	≤ 15,0 % ([1])
Włókno surowe	≥ 2,0 %
Zawartość wilgoci	≥ 12 %
Popiół	≥ 8 %

([1]) W niektórych regionach jedyną paszą dla ryb, jaką można będzie pozyskać, będzie pasza o stężeniu lipidów niższym niż ten górny limit. W takich przypadkach badania należy przeprowadzić przy niższym poziomie stężenia lipidów w podawanej paszy, dostosowując częstotliwość karmienia w taki sposób, by utrzymać dobry stan zdrowia ryb. Poziomu lipidów w paszy nie należy w sztuczny sposób podwyższać poprzez dodawanie oleju.

2. PRZYKŁADY TECHNIK WZBOGACANIA PASZY

Uwagi ogólne

Paszę kontrolną należy przygotować w dokładnie taki sam sposób jak paszę wzbogaconą, ale nie należy dodawać do niej substancji badanej.

Aby sprawdzić stężenie substancji w paszy, do której dodano substancję, z pojedynczych porcji paszy należy pobrać trzy próbki, stosując odpowiednią metodę pobierania próbek, a następnie należy zmierzyć poziom stężenia substancji badanej lub poziom promieniotwórczości w pobranych próbkach. Należy wykazać wysoki poziom odzysku analitycznego (>85 %) przy niskim poziomie zróżnicowania między próbkami (trzy wartości stężenia substancji w próbkach pobranych na początku badania nie mogą odbiegać od średniego stężenia o więcej niż ±15 %).

W trakcie badania narażenia drogą pokarmową trzy próbki paszy przeznaczone do analizy należy pobrać w dniu 0 oraz pod koniec fazy wchłaniania, aby ustalić zawartość substancji badanej w paszy.

Przygotowywanie paszy dla ryb przy wykorzystaniu (czystego) materiału badanego w postaci płynnej

W pierwszej kolejności ustala się docelowe, nominalne badane stężenie w paszy dla ryb, do której dodano substancję badaną, np. 500 µg substancji badanej / g paszy. Następnie odpowiednią ilość czystej substancji badanej (ustaloną na podstawie masy molowej lub promieniotwórczości właściwej) dodaje się do paszy dla ryb o ustalonej masie znajdującej się w szklanym słoju lub w kolbie wyparki obrotowej. Masa paszy dla ryb powinna być odpowiednia do tego, by pasza ta mogła być spożywana przez całą fazę wchłaniania (biorąc pod uwagę konieczność zwiększania porcji przy każdorazowym karmieniu z uwagi na wzrost ryb). Paszę dla ryb / substancję badaną należy mieszać przez jedną noc, stosując metodę powolnego wirowania (np.

▼M7

przy wykorzystaniu mieszalnika obrotowego) lub stosując metodę obrotową w przypadku wykorzystania wyparki obrotowej z kolbą. Wzbogaconą paszę należy przechowywać w warunkach zapewniających możliwość utrzymania stabilności substancji badanej dodanej do paszy (np. w warunkach chłodniczych) do momentu jej wykorzystania.

Przygotowywanie paszy dla ryb przy wykorzystaniu nośnika w postaci oleju kukurydzianego lub oleju z ryb

Substancje badane w stanie stałym należy zmielić w moździerzu na drobny proszek. Substancje badane w postaci ciekłej należy dodać bezpośrednio do oleju kukurydzianego lub do oleju z ryb. Substancję badaną należy rozpuścić w określonej ilości oleju kukurydzianego lub oleju z ryb (np. 5–15 ml). Odpowiednią dawkę oleju należy przenieść do kolby wyparki obrotowej o odpowiedniej pojemności. Kolbę wykorzystywaną do przygotowania dawki oleju należy wypłukać dwiema niewielkimi podwielokrotnościami oleju i dodać je do kolby wyparki obrotowej, upewniając się, że cała rozpuszczona substancja badana znalazła się w kolbie wyparki. Aby zapewnić całkowite rozpuszczenie/rozproszenie badanej substancji w oleju (lub w przypadku wykorzystania więcej niż jednej substancji badanej w badaniu), należy zastosować mikromieszadło, zakorkować kolbę i energicznie mieszać mieszaninę przez całą noc. Do kolby należy dodać odpowiednią ilość paszy dla ryb (zazwyczaj w formie granulek) wykorzystywanej w badaniu, po czym zawartość kolby należy jednorodnie mieszać, ustawicznie obracając kolbę szklaną przez co najmniej 30 minut, ale najlepiej przez całą noc. Następnie wzbogaconą paszę należy odpowiednio przechowywać (np. w warunkach chłodniczych), aby zapewnić stabilność substancji badanej w paszy do chwili jej wykorzystania.

Przygotowywanie paszy dla ryb przy wykorzystaniu rozpuszczalnika organicznego

Odpowiednią ilość substancji badanej (ustaloną na podstawie masy molowej lub promieniotwórczości właściwej) wystarczającą do stworzenia docelowej dawki rozpuszcza się w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym (np. w cykloheksanie lub w acetonie; 10–40 ml, choć w stosownych przypadkach dopuszcza się zastosowanie większej objętości, w zależności od ilości paszy, która ma zostać wzbogacona). Podwielokrotność albo całość tego roztworu (dodawaną porcjami) należy wymieszać z paszą dla ryb, której masa będzie wystarczająca do tego, by można było osiągnąć wymagany poziom dawki nominalnej w badaniu. Paszę / substancję badaną można wymieszać w misce wykonanej ze stali nierdzewnej i pozostawić świeżo przygotowaną dawkę paszy dla ryb w misce umieszczonej pod okapem laboratoryjnym na dwa dni (od czasu do czasu mieszając jej zawartość), aby nadmiar rozpuszczalnika mógł odparować, lub wymieszać paszę / substancję badaną w kolbie stale obracającej się wyparki obrotowej. W stosownych przypadkach nadmiar rozpuszczalnika należy „zdmuchnąć” strumieniem powietrza lub azotu. Należy dopilnować, aby substancja badana nie podlegała krystalizacji w miarę usuwania rozpuszczalnika. Wzbogaconą paszę należy przechowywać w warunkach zapewniających możliwość utrzymania stabilności substancji badanej dodanej do paszy (np. w warunkach chłodniczych) do momentu jej wykorzystania.

3. OBLICZANIE WYDAJNOŚCI PRZYSWAJANIA I WSPÓŁCZYNNIKA BIOMAGNIFIKACJI

Aby obliczyć wydajność przyswajania, należy w pierwszej kolejności oszacować wartość ogólnej stałej szybkości wydalania zgodnie z sekcją 4 w dodatku 5 (stosując „metodę sekwencyjną”, tj. standardową regresję liniową) w oparciu o średnie stężenia próbek pobranych w fazie wydalania. Stała częstotliwości karmienia, I, oraz czas wchłaniania, t, stanowią stałe parametry w ramach badania. C_{pasza}, tj. średnie zmierzone stężenie substancji badanej w paszy, stanowi zmienną mierzoną w trakcie badania. $C_{0,\text{d}}$, stężenie substancji badanej u ryb pod koniec fazy wchłaniania, zazwyczaj wyprowadza się z punktu przecięcia wykreślonej na wykresie krzywej ln (stężenie) w stosunku do dnia fazy wydalania.

Wydajność przyswajania substancji (a, wchłanianie substancji badanej na całej długości jelita) oblicza się za pomocą następującego równania:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{pasza}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Równanie A7.1]}$$

gdzie:

$C_{0,d}$ = wyprowadzona wartość stężenia u ryb w czasie zerowym fazy wydalania (mg kg^{-1});

▼M7

k_2 = ogólna (nieskorygowana pod kątem wzrostu) stała szybkości wydalania (dzień$^{-1}$) obliczona zgodnie z równaniami przedstawionymi w sekcji 3 w dodatku 5;

I = stała częstotliwości karmienia (g paszy g^{-1} ryby dzień$^{-1}$);

C_{pasza} = stężenie w paszy (mg kg^{-1} paszy);

t = czas trwania okresu karmienia (dni)

Jeżeli w obliczeniach wykorzystuje się stałą częstotliwości karmienia (I), precyzyjne określenie poziomu wydajności przyswajania (a) może wiązać się z koniecznością dostosowania wartości tej stałej pod kątem wzrostu ryb. Jeżeli w fazie wchłaniania danego badania dochodzi do istotnego wzrostu ryb (z tytułu którego nie dokonano żadnej korekty ilości paszy w celu utrzymania wyznaczonej częstotliwości karmienia), w miarę upływu fazy wchłaniania faktyczna częstotliwość karmienia będzie malała, osiągając poziom niższy niż wyznaczony, co doprowadzi do zwiększenia „rzeczywistej" wydajności przyswajania. (Należy zwrócić uwagę na fakt, że kwestia ta nie wywiera wpływu na ogólne obliczenia poziomu BMF, ponieważ stała I zostaje skutecznie zniwelowana po zastosowaniu równań A7.1 i A7.4). Średnią częstotliwość karmienia skorygowaną pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu, I_g, można wyprowadzić na szereg sposobów, ale najprostsza i najpewniejsza metoda jej wyprowadzenia zakłada oparcie się na znanej stałej szybkości wzrostu (k_g) w celu oszacowania masy ryb doświadczalnych na poszczególnych etapach fazy wchłaniania, tj.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Równanie A7.2]}$$

gdzie:

$W_f(t)$ = średnia masa ryb w określonym dniu fazy wchłaniania t

$W_{f,0}$ = średnia masa ryb na początku doświadczenia

Dzięki zastosowaniu tej metody można oszacować (przynajmniej) średnią masę ryb w ostatnim dniu narażenia na działanie substancji ($W_{f,koniec\ fazy\ wchłaniania}$). Ponieważ częstotliwość karmienia wyznaczono w oparciu o wartość $W_{f,0}$, faktyczną częstotliwość karmienia dla każdego dnia fazy wchłaniania można obliczyć w oparciu o powyższe dwie wartości masy. Wartość częstotliwości karmienia skorygowanej pod kątem wzrostu, I_g (g paszy g^{-1} masy ciała ryby dzień$^{-1}$), z której należy korzystać zamiast stałej I w przypadku szybkiego wzrostu w trakcie fazy wchłaniania, można obliczyć na podstawie poniższego równania

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,koniec\ fazy\ wchłaniania}} \qquad \text{[Równanie A7.3]}$$

Po ustaleniu wydajności przyswajania BMF można obliczyć, mnożąc wydajność przyswajania przez wartość stałej częstotliwości karmienia I (lub I_g, jeżeli współczynnik ten wykorzystano przy obliczaniu wartości α) i dzieląc uzyskany wynik przez wartość ogólnej stałej szybkości wydalania k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[Równanie A7.4]}$$

Współczynnik biomagnifikacji skorygowany pod kątem wzrostu również należy obliczyć w ten sam sposób, korzystając ze stałej szybkości wydalania skorygowanej pod kątem wzrostu (wyprowadzonej zgodnie z sekcją 7 w dodatku 5). Ponownie, jeżeli wartość α została wyliczona w oparciu o stałą I_g, w obliczeniach należy wykorzystać tę stałą, a nie stałą I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[Równanie A7.5]}$$

gdzie:

α = wydajność przyswajania (wchłanianie substancji badanej na całej długości jelita);

k_2 = ogólna (nieskorygowana pod kątem wzrostu) stała szybkości wydalania (dzień$^{-1}$) obliczona zgodnie z równaniami przedstawionymi w sekcji 3 w dodatku 5;

▼M7

k_{2g} = skorygowana pod kątem wzrostu stała szybkości wydalania (dzień$^{-1}$);

I = stała częstotliwości karmienia (g paszy g^{-1} masy ryby dzień$^{-1}$);

Wartość okresu półtrwania skorygowanego pod kątem wzrostu ($t_{1/2}$) oblicza się w następujący sposób.

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[Równanie A7.6]}$$

Wydajność przyswajania substancji z paszy można również oszacować, jeżeli w fazie liniowej w ramach fazy wchłaniania stwierdzono wystąpienie pozostałości w tkankach (w dniach 1–3). W takim przypadku wydajność przyswajania substancji (α) można ustalić w następujący sposób

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{pasza} \times t} \qquad \text{[Równanie A7.7]}$$

gdzie:

$C_{\text{ryba}(t)}$ = stężenie substancji badanej u ryb w czasie t (mg kg^{-1} mokrej masy).

4. KOREKTA POD KĄTEM ZAWARTOŚCI LIPIDÓW

Jeżeli w odniesieniu do tej samej ryby dokonano pomiaru zawartości lipidów i przeprowadzono analizę chemiczną we wszystkich okresach pobierania próbek, poszczególne stężenia należy skorygować pod kątem zawartości lipidów, a wartość ln (stężenie, korekta pod kątem zawartości lipidów) należy wykreślić na wykresie względem czasu trwania fazy wydalania (w dniach), aby uzyskać wartość $C_{0,\text{d}}$ i k_2. Wydajność przyswajania (równanie A7.1) będzie mogła zostać następnie obliczona na podstawie poziomu lipidów w oparciu o wartość C_{pasza} obliczoną na podstawie poziomu lipidów (tj. wartość C_{pasza} pomnożoną przez średnią frakcję lipidową paszy). Późniejsze obliczenia przeprowadzone w oparciu o równania A7.4 i A7.5 pozwolą bezpośrednio wyliczyć wartość BMF skorygowanego pod kątem zawartości lipidów (i pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu).

W przeciwnym razie średnią frakcję lipidową (w/w) u ryb i w paszy wyprowadza się zarówno dla grupy badanej, jak i dla grupy kontrolnej (w przypadku paszy i ryb należących do grupy kontrolnej wartość ta będzie zazwyczaj odpowiadała wartości zmierzonej na początku i pod koniec fazy narażenia na działanie substancji; w przypadku grupy badanej wartość ta będzie zazwyczaj odpowiadała wyłącznie wartości zmierzonej pod koniec fazy narażenia na działanie substancji). W trakcie niektórych badań zawartość lipidów u ryb może istotnie wzrosnąć; w takich przypadkach lepszym rozwiązaniem jest oparcie się na średnim stężeniu lipidów u ryb doświadczalnych obliczonym na podstawie wartości pomiarowych odnotowanych pod koniec fazy narażenia na działanie substancji i pod koniec fazy wydalania. Ogólnie rzecz biorąc, dane dotyczące grupy badanej powinny być wykorzystywane wyłącznie do wyprowadzenia obydwu frakcji lipidowych.

Wartość współczynnika korygującego poziom lipidów (L_c) oblicza się na podstawie następującego równania:

$$L_C = \frac{L_{ryby}}{L_{pasza}} \qquad \text{[Równanie A7.8]}$$

gdzie L_{ryby} i L_{pasza} odpowiadają średnim frakcjom lipidowym odpowiednio u ryb i w paszy.

Współczynnik korygujący poziom lipidów wykorzystuje się przy obliczaniu współczynnika biomagnifikacji skorygowanego pod kątem poziomu lipidów (BMF_{L}):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[Równanie A7.9]}$$

5. OCENA RÓŻNIC MIĘDZY ZMIERZONYM STĘŻENIEM W CZASIE ZEROWYM ($C_{0,\text{M}}$) A WYPROWADZONYM STĘŻENIEM W CZASIE ZEROWYM ($C_{0,\text{D}}$)

Należy porównać wartość zmierzonego stężenia w czasie zerowym ($C_{0,\text{m}}$) i wyprowadzonego stężenia w czasie zerowym ($C_{0,\text{d}}$). Jeżeli okaże się, że wartość tych stężeń jest bardzo podobna, zaleca się zastosowanie modelu reakcji pierwszego rzędu wykorzystywanego do wyprowadzania parametrów wydalania.

▼M7

W niektórych badaniach może wystąpić istotna różnica między wyprowadzoną wartością w czasie zerowym, $C_{0,d}$, a średnim zmierzonym stężeniem w czasie zerowym, $C_{0,m}$ (zob. pkt 159 ppkt ostatni niniejszej metody badawczej). Jeżeli wartość $C_{0,d}$ będzie zdecydowanie niższa niż wartość $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), taka różnica może świadczyć o obecności nieprzetrawionej wzbogaconej paszy w jelicie. Hipotezę tę można potwierdzić doświadczalnie, przeprowadzając odrębną analizę na wycinku jelita, jeżeli pod koniec fazy wchłaniania pobrano dodatkowe próbki (w postaci całych ryb) i zdecydowano się je przechować. W przeciwnym razie, jeżeli wyniki statystycznie ważnego testu na wartość odstającą przeprowadzonego w odniesieniu do regresji liniowej odnotowanej w fazie wydalania wykażą, że pierwszy moment pobierania próbek w fazie wydalania został błędnie zawyżony, należy rozważyć możliwość obliczenia regresji liniowej w celu wyprowadzenia wartości k_2 z pominięciem pierwszego punku pomiaru stężenia w fazie wydalania. W takich przypadkach, jeżeli niepewność pomiaru w ramach regresji liniowej zostanie w istotny sposób zmniejszona i jeżeli wystąpią przesłanki wskazujące niezbicie, że dana reakcja w fazie wydalania przebiegała zasadniczo według kinetyki pierwszego rzędu, można rozważyć możliwość wykorzystania uzyskanych wartości $C_{0,d}$ i k_2 w obliczeniach wydajności przyswajania. Podjęcie takiej decyzji należy w wyczerpujący sposób uzasadnić w sprawozdaniu. Może również okazać się, że reakcje w fazie wydalania przebiegały zgodnie z kinetyką inną niż kinetyka pierwszego rzędu. W przypadku uzasadnionego podejrzenia, że reakcje wydalania przebiegały zgodnie z kinetyką inną niż kinetyka pierwszego rzędu (tj. w przypadku gdy dane poddane przekształceniu w oparciu o logarytm naturalny będą zdawały się odpowiadać wykreślonej na wykresie prostej regresji liniowej), obliczenia wartości k_2 i $C_{0,d}$ najprawdopodobniej nie będą ważne – należy wówczas zasięgnąć porady biostatystyka.

Jeżeli wartość $C_{0,d}$ będzie zdecydowanie wyższa niż wartość pomiarowa ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), może to świadczyć o tym, że: substancja została wydalona bardzo szybko (tj. punkty pobierania próbek zostały wyznaczone blisko granicy oznaczalności danej metody analitycznej na wczesnym etapie fazy wydalania, por. sekcja 6 poniżej); reakcje w fazie wydalania nie przebiegały w pełni zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu; regresja liniowa, na podstawie której wyprowadzono wartość k_2 i $C_{0,d}$ została błędnie obliczona; lub że w niektórych okresach pobierania próbek w trakcie badania wystąpiły problemy związane z pomiarem stężeń. W takich przypadkach należy uważnie przeanalizować regresję liniową wykreśloną na wykresie pod kątem dowodów świadczących o pobraniu próbek na granicy oznaczalności lub w pobliżu granicy oznaczalności, a także pod kątem wartości odstających i oczywistych krzywizn (wskazujących na to, że dana reakcja przebiega według kinetyki innej niż kinetyka pierwszego rzędu), odnotowując poczynione obserwacje w sprawozdaniu. Wszelka późniejsza ponowna ocena regresji liniowej przeprowadzana w celu poprawy jakości wartości szacunkowych powinna zostać opisana i uzasadniona. Jeżeli stwierdzono, że przebieg danej reakcji istotnie odbiega od kinetyki pierwszego rzędu, obliczenia wartości k_2 i $C_{0,d}$ najprawdopodobniej nie będą ważne – należy wówczas zasięgnąć porady biostatystyka.

6. WSKAZÓWKI DOTYCZĄCE SUBSTANCJI BADANYCH PODLEGAJĄCYCH BARDZO SZYBKIEMU WYDALENIU

Jak wskazano w pkt 129 metody badawczej, szybkość wydalania niektórych substancji może być na tyle duża, że wiarygodne wyznaczenie wartości stężenia w czasie zerowym, $C_{0,d}$, oraz wartości k_2 nie będzie możliwe, ponieważ dokonanie pomiaru stężenia substancji w próbkach pobranych na bardzo wczesnym etapie fazy wydalania (tj. począwszy od drugiej próbki pobranej w fazie wydalania) nie będzie już możliwe (stężenia zgłaszane na granicy oznaczalności). Do takiej sytuacji doszło w trakcie badań międzylaboratoryjnych z wykorzystaniem benzo[a]pirenu przeprowadzonych w celu potwierdzenia niniejszej metody badawczej – wyniki tych badań zostały udokumentowane w sprawozdaniu z weryfikacji niniejszej metody. W takich przypadkach wiarygodne obliczenie regresji liniowej nie jest możliwe, ponieważ wyprowadzona szacunkowa wartość $C_{0,d}$ byłaby zbyt wysoka, przez co pozorna wartość wydajności przyswajania byłaby znacznie wyższa od 1. W takiej sytuacji można zachowawczo oszacować wartość k_2 oraz „górną granicę” BMF.

Obliczenie regresji liniowej (przy wykorzystaniu danych dotyczących stężenia poddanych przekształceniu w oparciu o logarytm naturalny zestawionych z osią czasu) w oparciu o te punkty danych w fazie wydalania, w których dokonano pomiaru stężenia – do punktu pomiaru pierwszego „niewykrywalnego” stężenia włącznie (stężenia na granicy oznaczalności),

▼M7

zapewni możliwość oszacowania wartości k_2. W takich przypadkach najprawdopodobniej wykorzystane zostaną tylko dwa punkty danych (np. pierwszy i drugi dzień pobierania próbek w trakcie fazy wydalania), po czym wartość k_2 będzie można oszacować na podstawie równania A5.22 w dodatku 5. Wspomniana szacunkowa wartość k_2 może zostać wykorzystana do oszacowania wydajności przyswajania zgodnie z równaniem A7.1 po zastąpieniu wartości $C_{0,d}$ w równaniu zmierzonym stężeniem w czasie zerowym ($C_{0,m}$), jeżeli szacunkowa wartość $C_{0,d}$ będzie ewidentnie zdecydowanie wyższa niż wartość możliwa do osiągnięcia w trakcie badania. Jeżeli wartość $C_{0,m}$ okaże się niemierzalna, należy zastosować granicę wykrywalności w tkankach ryb. Jeżeli – w określonych przypadkach – uzyskana w ten sposób wartość α będzie większa niż 1, uznaje się, że wydajność przyswajania będzie w „najgorszym przypadku" wynosiła 1.

Następnie w oparciu o równanie A7.4 można oszacować maksymalną wartość BMF_K, która powinna zostać podana jako wartość „znacznie niższa niż" (<<). Na przykład w przypadku badania przeprowadzonego przy częstotliwości karmienia wynoszącej 3 %, przy okresie półtrwania wydalania krótszym niż 3 dni i przy założeniu, że wartość α będzie w „najgorszym przypadku" wynosiła 1, wartość BMF_K będzie prawdopodobnie niższa niż 0,13. Biorąc pod cel, w jakim przeprowadza się te szacunki, oraz fakt, że uzyskane wartości będą miały zachowawczy charakter, skorygowanie ich pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu lub zawartości lipidów u ryb i w paszy nie jest konieczne.

▼M7

Dodatek 8

PODEJŚCIA WYKORZYSTYWANE W CELU OSZACOWANIA WSTĘPNEJ WARTOŚCI BCF NA PODSTAWIE DANYCH ZGROMADZONYCH W RAMACH BADANIA NARAŻENIA DROGĄ POKARMOWĄ

Metoda narażenia drogą pokarmową została uwzględniona w niniejszej metodzie badawczej na potrzeby badania bioakumulacji substancji, których nie można w praktyce zbadać za pomocą metody narażenia drogą wodną. Metoda narażenia drogą wodną zapewnia prowadzi do uzyskania współczynnika biokoncentracji, natomiast metoda narażenia drogą pokarmową pozwala bezpośrednio uzyskać informacje dotyczące potencjału biomagnifikacji wynikającego z diety. W ramach wielu systemów bezpieczeństwa chemicznego obowiązuje wymóg podania informacji dotyczących poziomu biokoncentracji w wodzie (dotyczy to np. oceny ryzyka oraz Globalnego Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji). Dlatego też przy szacowaniu współczynnika biokoncentracji należy oprzeć się na danych pozyskanych w ramach badania narażenia drogą pokarmową, które będzie porównywalne z danymi uzyskanymi w ramach badań przeprowadzonych zgodnie z metodą narażenia drogą wodną ([1]). W niniejszej sekcji zbadano podejścia, które można zastosować, aby osiągnąć ten cel, zwracając jednocześnie uwagę na niedociągnięcia nieodzownie związane z tymi szacunkami.

W badaniu narażenia drogą pokarmową mierzy się wydalanie, aby obliczyć stałą szybkości wydalania, k_2. Jeżeli oszacowanie stałej szybkości wchłaniania w oparciu o dostępne dane okaże się możliwe w sytuacji, w której ryby zostały narażone na działanie badanej substancji za pośrednictwem wody, można będzie oszacować również wartość kinetycznego BCF.

Szacunkowa wartość stałej szybkości wchłaniania w przypadku narażenia na działanie badanej substancji w wodzie będzie zależała od wielu założeń, z których wszystkie będą przyczyniały się do zwiększenia poziomu niepewności pomiaru sporządzanych szacunków. Ponadto w ramach przedmiotowego podejścia do szacowania poziomu BCF zakłada się, że ogólna szybkość wydalania (uwzględniając czynniki współdecydujące, takie jak rozkład w ciele i indywidualne procesy wydalania) będzie niezależna od techniki narażenia na działanie substancji zastosowanej w celu doprowadzenia do skażenia organizmu substancją badaną.

Poniżej przedstawiono podsumowanie głównych założeń nieodzownie związanych z metodą szacowania.

Wydalanie danej substancji po jej wchłonięciu drogą pokarmową przebiega w taki sam sposób jak wydalanie tej substancji w przypadku narażenia drogą wodną

Reakcja wchłaniania z wody będzie przebiegała według kinetyki pierwszego rzędu

W zależności od metody zastosowanej w celu oszacowania szybkości wchłaniania:

— proces wchłaniania można powiązać z samą masą ryb

— proces wchłaniania można powiązać z samym współczynnikiem podziału n-oktanol/woda danej substancji

— proces wchłaniania można powiązać zarówno z masą ryb, jak i z współczynnikiem podziału n-oktanol/woda danej substancji

— skala oddziaływania czynników, które mogą w praktyce wpłynąć na proces wchłaniania w badaniu narażenia drogą wodną, np. biodostępność substancji, poziom adsorpcji na aparaturze, wielkość cząsteczek itp., będzie znikoma

— oraz, co istotne:

Baza danych („zestaw szkoleniowy”), na podstawie której opracowano metodę szacowania szybkości wchłaniania, jest reprezentatywna dla badanej substancji

W szeregu ogólnie dostępnych publikacji wyprowadzono równania dotyczące wchłaniania substancji z wody u ryb za pośrednictwem skrzeli względem współczynnika podziału n-oktanol/woda danej substancji, masy ciała ryb (1) (2) (3) (4), objętości lub zawartości lipidów, przenikania/dyfuzji przez membranę (5) (6), objętości oddechowej ryb (7) oraz podejścia bazującego na lotności / bilansie masy (8) (9) (10). Szczegółowa ocena metod stosowanych w tym kontekście została przedstawiona w opracowaniu autorstwa Crookesa i Brooke'a (11). Publikację autorstwa Barbera (12), która dotyczyła głównie modelowania bioakumulacji poprzez monitorowanie wchłaniania substancji podanej w paszy, również

([1]) W środowisku naturalnym drogą prowadzącą do największego narażenia na działanie substancji w środowiskach wodnych jest prawdopodobnie spożycia wysoce hydrofobowych substancji – w takim przypadku szacunkowa wartość BCF nie odzwierciedla precyzyjnie potencjału bioakumulacyjnego danej substancji.

▼M7

należy uznać za przydatną w tym kontekście, ponieważ zawiera ona dane pozyskane dzięki zastosowaniu modeli służących do analizowania szybkości wchłaniania przez skrzela. Jedna z sekcji dokumentu bazowego załączonego do protokołu dotyczącego narażenia drogą pokarmową z 2004 r. (13) również jest poświęcona tej problematyce.

Wydaje się, że większość tych modeli została opracowana w oparciu o bazy danych zawierające ograniczoną ilość informacji. Jeżeli chodzi o modele, w przypadku których można uzyskać szczegółowe informacje na temat baz danych wykorzystanych do ich stworzenia, wydaje się, że takie modele są tworzone w oparciu o typy substancji o podobnej strukturze lub typy substancji należące do podobnej klasy (pod względem pełnionej przez nie funkcji, np. związki chloroorganiczne). Przyczynia się to do zwiększenia niepewności pomiaru, jeżeli model wykorzystuje się do prognozowania nie tylko parametrów właściwych dla danego badania, takich jak gatunek, temperatura itp., ale również stałej szybkości wchłaniania innego rodzaju substancji.

W przeglądzie dostępnych technik (11) podkreślono, że żadnej konkretnej metody nie można uznać za „bardziej prawidłową" od innej. Dlatego też należy przedstawić przejrzyste uzasadnienie decyzji o zastosowaniu określonego modelu. W przypadku istnienia szeregu metod, których zastosowanie można uznać za uzasadnione, warto rozważyć możliwość przedstawienia szeregu szacunków wartości k_1 (oraz BCF) lub zakresu wartości k_1 (oraz BCF) ustalonych zgodnie z różnymi metodami szacowania szybkości wchłaniania. Biorąc jednak pod uwagę różnice między poszczególnymi rodzajami modeli i zbiorami danych, na podstawie których je opracowano, zastosowanie średniej wartości ustalonej w oparciu o szacunki sporządzone na różne sposoby może nie być właściwe.

W opinii części badaczy w odniesieniu do tego rodzaju szacunków poziomu BCF należy dokonać korekty z tytułu biodostępności, aby wziąć pod uwagę adsorpcję substancji do rozpuszczalnego węgla organicznego (RWO) w warunkach narażenia drogą wodną i aby zapewnić zgodność szacunków z wynikami badań narażenia na działanie substancji w wodzie (np. (13) (14)). Dokonanie takiej korekty może jednak nie być uzasadnione, biorąc pod uwagę niskie poziomy RWO wymagane do sporządzenia szacunków zakładających wystąpienie „najgorszego przypadku" w badaniu narażenia drogą wodną (tj. stosunek stężenia substancji biodostępnej do stężenia substancji zmierzonego w roztworze). W przypadku wysoce hydrofobowych substancji szybkość wchłaniania przez skrzela może być ograniczona szybkością biernej dyfuzji przy powierzchni skrzeli; w takim przypadku może dojść do sytuacji, w której korekta zostanie zastosowana ze względu na wystąpienie tego zjawiska, a nie ze względów, dla których powinna zostać zastosowana.

Zaleca się, aby skoncentrować się na metodach wymagających oparcia się na danych wejściowych dotyczących badanych substancji, które można będzie łatwo pozyskać w ramach opisanego tutaj badania narażenia drogą pokarmową (tj. $\log K_{OW}$, masa ryb). Można zastosować również inne metody wymagające oparcia się na bardziej złożonych danych wejściowych, ale może wiązać się to z koniecznością przeprowadzenia dodatkowych pomiarów w ramach badania lub dysponowania szczegółową wiedzą na temat danej substancji badanej lub danego gatunku ryby, która może nie być powszechnie dostępna. Ponadto na decyzję o wyborze modelu może wpłynąć również poziom walidacji i dziedzina zastosowania (aby zapoznać się z wynikami przeglądu i analizy porównawczej różnych metod, zob. (11)).

Należy pamiętać o tym, że uzyskane szacunkowe wartości k_1 i BCF są niepotwierdzone, co może wiązać się z koniecznością korzystania z nich zgodnie z podejściem bazującym na wadze dowodów, podobnie jak ma to miejsce w przypadku wyprowadzonej wartości BMF i wyprowadzonych parametrów substancji (np. wielkości cząstek), aby uzyskać całościowy obraz potencjału bioakumulacyjnego danej substancji. Sposób interpretowania tych parametrów i ich wykorzystywania może zależeć od obowiązujących ram regulacyjnych.

BIBLIOGRAFIA

(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. **BADANIE ROZWOJU MŁODYCH RYB**

1. **METODA**

Niniejsza metoda wpływu toksyczności na rozwój jest kopią OECD TG 215 (2000).

1.1. WPROWADZENIE

Niniejszy badanie jest przeznaczone do oceny skutków przedłużonej ekspozycji na działanie substancji chemicznych na rozwój młodocianych ryb. Jest on oparty na metodzie, rozwiniętej i powszechnie stosowanej (1)(2) w ramach Unii Europejskiej, dla oceny działania substancji chemicznych na rozwój młodego pstrąga tęczowego (*Oncorynchus mykiss*) w warunkach przepływowych. Inne dobrze udokumentowane gatunki można również zastosować. Na przykład uzyskano doświadczenie z badań rozwoju danio pręgowanego (*Danio rerio*) ([1]) (3)(4) i *Oryzias latipes* (5)(6)(7).

Zob. także Ogólne wprowadzenie część C.

1.2. DEFINICJE

Najniższy obserwowany skutek stężenia (LOEC): jest to najmniejsze badane stężenie substancji badanej, przy którym obserwuje się znaczący skutek (przy $p < 0,05$) w porównaniu z doświadczeniem kontrolnym. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC muszą wykazywać szkodliwy skutek, równy lub większy niż ten obserwowany przy LOEC.

Nieobserwowany skutek stężenia (NOEC): jest stężeniem badanym bezpośrednio poniżej LOEC.

EC_x: w niniejszej metodzie jest stężeniem badanej substancji, która powoduje x % zmienności we wskaźniku rozwoju ryb w porównaniu z doświadczeniem kontrolnym.

Wskaźnik obciążenia: jest wilgotną masą ryb na objętość wody.

Gęstość wyjściowa: jest liczbą ryb do objętości wody.

Wskaźnik szczególnego rozwoju określonej ryby: wyrażenie wskaźnika rozwoju określonej jednostki w oparciu o jej początkową wagę.

Średni zbiornikowy wskaźnik szczególnego rozwoju: wyrażenie średniego wskaźnika wzrostu populacji w zbiorniku przy jednym stężeniu.

Wskaźnik pseudoszczególnego rozwoju: wyrażenie wskaźnika określonego rozwoju w proporcji do średniej wagi początkowej populacji zbiornika.

([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. ZASADA METODY BADANIA

Młode ryby w fazie wykładniczej rozwoju są umieszczane po zważeniu w komorach do badań i eksponowane w zakresie stężenia subletalnego substancji badanej rozpuszczonej w najlepiej strumieniem wody lub jeśli to niemożliwe, we właściwych, półstatycznych (statycznie odnawialnych) warunkach. Czas trwania badania wynosi 28 dni. Ryby są karmione codziennie. Racje żywności są oparte na początkowej wadze ryb i przeliczane po 14 dniach. Na koniec badania ryby są ważone ponownie. Skutki w odniesieniu do wskaźników rozwoju są analizowane, stosując model regresyjny w celu prognozowania stężenia, które spowoduje x % zmienności w wskaźniku rozwoju, tj. EC_x (np. EC_{10}, EC_{20} lub EC_{30}). Alternatywnie, dane są porównywane z objętością w doświadczeniu kontrolnym w celu ustalenia najniższego obserwowanego skutku stężenia (LOEC), a stąd też nieobserwowanego skutku stężenia (NOEC).

1.4. INFORMACJE DOTYCZĄCE SUBSTANCJI BADANEJ

Wyniki badania ostrej toksyczności (zob. metoda badania C.1), najlepiej przeprowadzone z gatunkami wybranymi do niniejszego badania, powinny być dostępne. Oznacza to, że rozpuszczalność w wodzie i ciśnienie pary badanej substancji są znane, a wiarygodna analityczna metoda jest dostępna w odniesieniu do ujęcia ilościowego substancji w roztworach badanych, ze znaną i udokumentowaną dokładnością oraz granicą wykrywalności.

Użyteczne informacje obejmują wzór strukturalny, czystość substancji, stabilność w wodzie i na świetle, pK_a, P_{ow} oraz wyniki badania całkowitej biodegradacji (zob. metoda C.4).

1.5. WAŻNOŚĆ BADANIA

Aby badanie był ważne, stosuje się następujące warunki:

— śmiertelność w doświadczeniach kontrolnych nie może przekraczać 10 % na koniec badania,

— średnia waga ryb w doświadczeniach kontrolnych musi wzrosnąć wystarczająco, aby pozwolić na wykrycie minimalnych zmian wskaźnika rozwoju uznanego za znaczący. Próba pierścieniowa (2) wykazała, że w odniesieniu do pstrąga tęczowego średnia waga ryb w doświadczeniach kontrolnych wzrosła co najmniej o połowę (tj. 50 %) ich średniej wagi początkowej przez ponad 28 dni; tj. waga początkowa: 1 g/ryba (= 100 %), waga końcowa po 28 dniach: ≥ 1,5 g/ryba (≥ 150 %),

— stężenie tlenu rozpuszczonego musi wynosić co najmniej 60 % wartości nasycenia powietrzem (ASV) w trakcie badania,

— różnica temperatury wody nie może być większa niż ± 1 °C między komorami do badań przez cały czas trwania badania i musi być utrzymywana w obrębie 2 °C zakresu temperatur określonego w odniesieniu do gatunków badanych (dodatek 1).

1.6. OPIS METODY BADANIA

1.6.1. **Aparatura**

Zwykły sprzęt laboratoryjny, w szczególności następujący:

— mierniki tlenu i pH metry,

▼B

— sprzęt do oznaczania alkaliczności i twardości wody,

— odpowiednia aparatura do pomiaru temperatury, zalecane jest stałe monitorowanie,

— zbiorniki wykonane z chemicznie obojętnego materiału o odpowiedniej objętości w zależności do zalecanej gęstości wyjściowej i obciążenia (zob. pkt 1.8.5 i dodatek 1),

— waga o odpowiedniej dokładności (tj. dokładności do ± 0,5 %).

1.6.2. **Woda**

Każda woda, w której badane gatunki wykazują odpowiednie długoterminowe przeżycie i wzrost, może być stosowana jako woda do badań. Musi być stałej jakości w okresie trwania badania. Wartość pH wody powinna być w zakresie 6,5–8,5, lecz w trakcie danego badania musi być w zakresie ± 0,5 pH. Twardość powyżej 140 mg/l (jako $CaCO_3$) jest zalecana. W celu zapewnienia, aby rozcieńczająca woda nie miała falowego wpływu na wyniki badania (np. przez kompleksowanie substancji badanej), należy okresowo pobierać próbki wody do analizy. Co trzy miesiące na przykład powinny być wykonane pomiary metali ciężkich (takich jak Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca, Mg, Na, K, Cl i SO_4), pestycydów (np. całkowita ilość fosforo- i chloroorganicznych), całkowity węgiel organiczny i zawiesina ciał stałych, w przypadku gdy rozcieńczająca woda jest znana jako stosunkowo stała w jakości. Jeśli można przedstawić dane, że jakość wody była stała przynajmniej przez rok, oznaczenia mogą być mniej częste i przedziały poszerza się (np. co sześć miesięcy). Kilka cech chemicznych akceptowalnej wody rozcieńczającej wymieniono w dodatku 2.

1.6.3. **Roztwory użyte w badaniu**

Roztwory w badaniu o wybranym stężeniu są przygotowywane poprzez rozcieńczanie roztworu podstawowego.

Zalecane jest przygotowanie roztworu podstawowego przez proste wymieszanie badanej substancji w wodzie rozcieńczającej w sposób mechaniczny (np. mieszadło lub ultradźwięki). Kolumny nasyceniowe (rozpuszczające) mogą być użyte do uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego.

W kilku przypadkach może być wymagane użycie rozpuszczalników lub dyspergatorów (środków rozpuszczających) w celu wykonania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Przykładami odpowiednich rozpuszczalników są aceton, etanol, metanol, dimetylosulfotlenek, dimetyloformamid i glikol trójetylenowy. Przykładami odpowiednich dyspergatorów są Cremophor RH40, Tween 80, Metyloceluloza 0,01 % i HCO-40. Należy zachować ostrożność przy użyciu łatwo biodegradowalnych środków (np. aceton) i/lub wysokolotnych związków, gdyż mogą być przyczyną problemów z rozwojem bakterii w przepływach badań. Gdy stosuje się środki rozpuszczające, nie mogą one mieć znaczącego wpływu na wzrost ryb i widocznych negatywnych działań na młode ryby, jak odkryto w doświadczeniu kontrolnym z rozpuszczalnikiem.

▼B

Dla badań przepływowych wymagany jest system ciągłego dozowania i rozcieńczania roztworu podstawowego substancji badanej (np. pompa dozująca, rozcieńczalnik proporcjonalny, system nasycania) do przesyłania serii stężeń do komór do badań. Szybkości przepływów roztworu podstawowego i rozcieńczającej wody muszą być sprawdzane okresowo, najlepiej codziennie w trakcie trwania badania, oraz nie mogą zmieniać się więcej niż 10 % w trakcie badania. Badanie pierścieniowe (2) wykazało, że w odniesieniu do pstrąga tęczowego częstotliwość wymiany wody w trakcie trwania badania jest akceptowalna przy 6 litrów/g ryby/dzień (zob. pkt 1.8.2.2).

Dla badań półstatycznych (odnawialnych) częstotliwość odnawiania ośrodka zależy od stabilności substancji badanej, lecz zalecane jest codzienne odnawianie wody. Jeśli ze wstępnych badań stabilności (zob. pkt 1.4) wynika, że stężenie substancji badanej nie jest stabilne (tj. poza zakresem nominalnego 80–120 % lub spada poniżej 80 % zmierzonego stężenia początkowego) przez okres odnowienia, należy rozważyć celowość użycia badania przepływowego.

1.6.4. **Wybór gatunków**

Pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss*) jest zalecanym gatunkiem do niniejszego badania, ponieważ uzyskano najwięcej doświadczeń z prób pierścieniowych z tym gatunkiem (1)(2). Można jednakże zastosować inne, dobrze udokumentowane gatunki, lecz może być niezbędne przyjęcie procedury badania w celu zapewnienia odpowiednich warunków badania. Dostępne są doświadczenia, na przykład z danio pręgowanym (*Danio rerio*) (3)(4) i *Oryzias latipes* (5)(6)(7). W takim przypadku powinno być podane racjonalne uzasadnienie wyboru i metody eksperymentalnej.

1.6.5. **Przetrzymanie ryb**

Badane ryby muszą być wybrane z populacji wyjściowej pojedynczo, najlepiej z tego samego tarła, przetrzymywanego co najmniej dwa tygodnie przed badaniem w warunkach jakości wody i oświetlenia zbliżonych do stosowanych w badaniu. Powinny one być karmione racją minimum 2 % wagi ciała dziennie, a najlepiej 4 % wagi ciała na dzień przez okres przetrzymania i w trakcie trwania badania.

Przez następujący od rozpoczęcia okres 48 godzin notowana jest śmiertelność i stosuje się następujące kryteria:

— śmiertelność większa niż 10 % populacji przez siedem dni: odrzucić całą partię,

— śmiertelność między 5 % i 10 % populacji: aklimatyzacja przez siedem dodatkowych dni, jeśli więcej niż 5 % śmiertelności w ciągu tych siedmiu dni, odrzucić całą partię,

— śmiertelność mniejsza od 5 % populacji w ciągu siedmiu dni: dopuścić partię.

Ryby nie mogą być taktowane leczniczo przez dwa tygodnie poprzedzające badanie ani w ciągu jego trwania.

▼B

1.7. PROJEKT BADANIA

„Projekt badania” odnosi się do wyboru ilości i odstępów stężeń badanych, liczbą zbiorników dla każdego poziomu i liczbą ryb na zbiornik. W idealnym przypadku taki projekt badania powinien być wybierany z uwzględnieniem:

— celu badania,

— metody statystycznej analizy, która będzie wykorzystana,

— dostępność i źródła finansowania eksperymentu.

Oświadczenie o celu badania powinno, jeśli jest to możliwe, określać statystyczną zdolność, przy której różnica danego wymiaru (np. we wskaźniku rozwoju) wymaganego jest możliwa do obserwacji lub, alternatywnie, precyzją, z jaką EC_x (na przykład x = 10, 20 lub 30, a najlepiej nie mniej niż 10) ma być oszacowane. Bez tego zwięzłego określenie zakresu badania nie może być podane.

Istotne jest, aby uznać, że projekt, który jest optymalny (najlepszy z użyciem źródeł) przy użyciu jednej metody analizy statystycznej, nie jest koniecznie optymalny dla innej. Zalecany projekt dla oszacowania LOEC/NOEC dlatego nie byłby taki sam jak zalecany dla analizy metodą regresji.

W większości przypadków, analiza regresyjna jest zalecana dla analizy wariancji, z przyczyn omówionych przez Stephan i Rogers (8). Jednakże jeżeli nie znaleziono odpowiedniego modelu regresji ($r^2 < 0,9$) powinna być zastosowana metoda NOEC/LOEC.

1.7.1. **Projekt analizy regresyjnej**

Ważnymi rozważaniami w projekcie badania, które mają być zanalizowane metodą regresyjną, są:

— skutek stężenia (np. $EC_{10, 20, 30}$) i zakres stężeń powyżej, którego wpływ substancji badanej jest poza zainteresowaniem, powinien być koniecznie osiągnięty przez stężenie włączone do badań. Dokładność, z którą ocena wpływu stężenia jest wykonywana, jest najlepsza, gdy wpływ stężenia jest pośrodku zakresu badanych stężeń. Wstępne badanie szukania zakresu może być pomocne w wybraniu właściwych stężeń badanych,

— w celu zapewnienia zadawalającego modelu statystycznego badanie powinno obejmować co najmniej jeden zbiornik kontrolny i pięć dodatkowych zbiorników o różnych stężeniach. Tam gdzie to jest stosowne, gdy stosowany jest środek ułatwiający rozpuszczanie, należy przeprowadzić obok serii badanej jedno doświadczenie kontrolne z tym środkiem przy najwyższym badanym stężeniu (zob. pkt 1.8.3 i 1.8.4),

— właściwe serie geometryczne lub serie logarytmiczne (9) (zob. dodatek 3) mogą być wykorzystane. Zaleca się odstępy logarytmiczne w stężeniach badanych,

▼B

— o ile jest dostępne więcej niż sześć zbiorników, dodatkowe zbiorniki muszą być użyte albo do zapewnienia powtórzenia lub rozdziału w poprzek zakresu stężeń, w celu zapewnienia bliższego odstępu poziomów. Oba z tych środków są w równym stopniu pożądane.

1.7.2. **Projekt dotyczący oszacowania NOEC/LOEC przy użyciu analizy wariancji (ANOVA)**

Zalecane jest posiadanie skopiowanych zbiorników dla każdego stężenia i analizy statystycznej na poziomie zbiornika (10). Bez skopiowanych zbiorników nie można zastosować poprawek dla zmienności między zbiornikami, poza spodziewanymi dla poszczególnych ryb. Jednakże doświadczenie pokazało (11), że zmienność między zbiornikami jest bardzo mała w porównaniu ze zmiennością w obrębie zbiorników (tj. między rybami) w badanym przypadku. Dlatego względnie dopuszczalną alternatywą jest przeprowadzenie analizy statystycznej na poziomie poszczególnych ryb.

Zwyczajowo stosuje się co najmniej pięć stężeń badanych w serii geometrycznej ze współczynnikiem zalecanym nieprzekraczającym 3,2.

Ogólnie, gdy badania są prowadzone ze skopiowanymi zbiornikami, liczba skopiowanych zbiorników kontrolnych, a zatem i liczba ryb musi być podwojona przy każdym badaniu stężenia, które powinny być równoważnych rozmiarów (12)(13)(14). Z drugiej strony, przy nieobecności skopiowanych zbiorników, liczba ryb w grupie kontrolnej powinna być taka sama jak liczba przy każdym badaniu stężenia.

Jeśli ANOVA ma opierać się na zbiornikach, a nie na poszczególnych rybach (pociąga to albo oznaczanie poszczególnych ryb albo użycie „pseudoszczególnych" wskaźników rozwoju (zob. pkt 2.1.2), zachodzi potrzeba wystarczającego skopiowania zbiorników w celu zapewnienia oznaczenia standardowego odchylenia „stężeń w obrębie zbiorników". To oznacza, że stopień swobody błędu w analizie wariancji musi wynosić co najmniej 5 (11). Jeśli tylko doświadczenia kontrolne są powielane zachodzi niebezpieczeństwo, że zmienność błędu będzie obciążona, ponieważ może to zwiększyć rozważaną wartość średnią wskaźnika rozwoju. Ponieważ wskaźnik rozwoju prawdopodobnie zmniejszy się ze wzrostem stężenia, będzie to powodowało przeszacowanie zmienności.

1.8. PROCEDURA

1.8.1. **Wybór i ważenie ryb badanych**

Istotne jest, aby zminimalizować zmienność wagi ryb na początku badania. Odpowiedni zakres wymiarowy dla różnych gatunków zalecanych do wykorzystania w tym badaniu podano w dodatku 1. W odniesieniu do całej partii ryb wykorzystanych w badaniu zakres poszczególnych wag na początku badania powinien być idealnie utrzymany w obrębie ± 10 % średniej arytmetycznej wagi, a w żadnym przypadku nie może przekraczać 25 %. Zalecane jest zważenie podpróbki ryb przed badaniem, w celu oszacowania średniej wagi.

▼B

Należy wstrzymać żywienie populacji na 24 godziny przed rozpoczęciem badania. Ryby powinny być wybrane losowo. Stosując ogólne znieczulenie (np. roztwór wodny 100 mg/l tricainy metanosulfonianu (MS 222) zneutralizowanej przez dodanie dwóch części dwuwęglanu sodu na jedną część MS 222), ryby powinny być zważone pojedynczo w stanie wilgotnym (osuszone) z dokładnością podaną w dodatku 1. Ryby, których waga jest w zamierzonym zakresie powinny być zatrzymane i następnie losowo rozdzielone do zbiorników do badań. Całkowita waga ryb w każdym zbiorniku powinna być odnotowana. Użycie znieczulenia ułatwia manipulację rybami (włączając suszenie i ważenie) może jednak powodować stres i zranienia dla młodocianych ryb, w szczególności dla gatunków o małych wymiarach. Dlatego manipulowanie młodocianymi rybami musi być wykonane z najwyższą troską, aby zapobiec stresom i zranieniom badanych zwierząt.

Ryby są ważone ponownie w 28 dniu badania (zob. pkt 1.8.6). Jednakże jeśli jest to uważane za niezbędne przeliczenie racji żywieniowej, ryby są ważone ponownie 14 dnia badania (zob. pkt 1.8.2.3). Inne metody, takie jak metoda fotograficzna, mogą być stosowane do ustalania zmiany rozmiarów ryb, na podstawie których można dostosować racje żywieniowe.

1.8.2. **Warunki ekspozycji**

1.8.2.1. *Czas trwania*

Czas trwania badania wynosi ≥ 28 dni.

1.8.2.2. *Wskaźnik obciążenia i gęstości wyjściowe*

Istotne jest, aby wskaźnik obciążenia i gęstość wyjściowa były właściwe dla wykorzystanych gatunków badanych (zob. dodatek 1). Jeśli gęstość wyjściowa jest za wysoka, wtedy stres z powodu zatłoczenia może prowadzić do zmniejszenia wskaźnika rozwoju i prawdopodobnie do choroby. Jeśli jest za mała, może wytwarzać zachowywanie terytorialne, które również wpływa na rozwój. W każdym przypadku wskaźnik obciążenia powinien być wystarczająco niski, aby stężenie tlenu rozpuszczonego wynosiło przynajmniej 60 % ASV i było utrzymywana bez napowietrzania. Próba pierścieniowa (2) pokazała, że w odniesieniu do pstrąga tęczowego wskaźnik obciążenia dla 16 pstrągów po 3–5 gram w 40-litrowej objętości jest dopuszczalny. Zalecana częstotliwość usuwania wody w czasie trwania badania wynosi 6 litrów/gram ryby/dzień.

1.8.2.3. *Karmienie*

Ryby muszą być karmione właściwym pokarmem (dodatek 1) w wystarczającej ilości dla wytworzenia akceptowalnego wskaźnika rozwoju. Należy zwrócić uwagę, aby zapobiec rozwojowi mikrobów i mętności wody. Dla pstrąga tęczowego wskaźnik 4 % ich wagi ciała dziennie prawdopodobnie spełnia te warunki (2)(15)(16)(17). Dzienna racja może być podzielona na dwie równe porcje i podawana rybom w dwóch posiłkach dziennie, w odstępie co najmniej pięciu godzin. Racje są oparte na początkowej całkowitej wadze ryb w każdym zbiorniku do badań. Jeśli ryby są ważone ponownie 14 dnia racje są wtedy przeliczane. Karmienie powinno być wstrzymane na 24 godziny przed ważeniem.

▼B

Niezjedzony pokarm i odchody ryb muszą być usuwane ze zbiorników do badań codziennie, poprzez staranne czyszczenie dna zbiorników stosując ssanie.

1.8.2.4. *Światło i temperatura*

Czas naświetlania i temperatura wody muszą być odpowiednie dla badanego gatunku (dodatek 1).

1.8.3. **Stężenia użyte w badaniu**

Zwykle wymagane jest pięć stężeń badanych, poza projektem badania (zob. pkt 1.7.2). Wcześniejsza znajomość toksyczności substancji badanej (np. z badania ostrej toksyczności i/lub ustalonego w badaniach zakresu) pomaga w doborze właściwych stężeń badanych. Najwyższe stężenie badane nie może przekraczać granicy rozpuszczalności substancji w wodzie.

W przypadku gdy środek ułatwiający rozpuszczenie towarzyszy w przygotowaniu roztworu wyjściowego jego końcowe stężenie nie może być większe niż 0,1 ml/l i zalecane jest takie same we wszystkich zbiornikach do badań (zob. pkt 1.6.3). Jednakże należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć użycia takich materiałów.

1.8.4. **Doświadczenia kontrolne**

Liczba doświadczeń kontrolnych wody rozcieńczającej zależy od projektu badania (zob. pkt 1.7–1.7.2). Jeśli stosowany jest środek ułatwiający rozpuszczanie, powinna być przeprowadzona taka sama liczba doświadczeń kontrolnych co liczba doświadczeń kontrolnych z wodą rozcieńczającą.

1.8.5. **Częstotliwość oznaczeń analitycznych i pomiarów**

W czasie trwania badania stężenia substancji badanej są oznaczane w regularnych odstępach czasu (zob. poniżej).

W badaniach przepływowych wskaźniki przepływu rozcieńczalnika i roztworu wyjściowego toksykanta muszą być sprawdzane w odstępach czasu, najlepiej codziennie, i nie mogą się zmieniać więcej niż 10 % w trakcie badania. W przypadku gdy oczekuje się, że stężenie badanej substancji będzie w zakresie ± 20 % wartości nominalnej (tj. w zakresie 80–120 %; zob. pkt 1.6.2 i 1.6.3), jest zalecane, aby jako minimum wykonać analizę najmniejszego i największego stężenia substancji badanej na początku badania i w tygodniowych odstępach czasu, w okresie późniejszym. W przypadku gdy oczekuje się, że stężenie substancji badanej pozostanie w zakresie ± 20 % nominalnej wartości (na podstawie danych stabilności substancji badanej), niezbędne jest analizowanie wszystkich stężeń badanych, ale przy zastosowaniu tego samego systemu.

W półstatycznych (odnawialnych) badaniach, w przypadku gdy oczekuje się, że stężenie badanej substancji pozostanie w zakresie ± 20 % nominalnej wartości, jest zalecane, aby jako minimum analizować najniższe i najwyższe stężenia badane świeżo po przygotowaniu i zaraz przed odnowieniem, na początku badań i cotygodniowo w okresie późniejszym. Dla badań gdzie nie oczekuje się, że stężenie substancji badanej pozostanie w zakresie ± 20 % nominału, wszystkie badane stężenia muszą być analizowane, przy zastosowaniu tego samego systemu co dla substancji bardziej stabilnych.

▼B

Zalecane jest, aby wyniki oparte były na pomierzonych stężeniach. Jeżeli jednakże dostępne dowody wykazują, że stężenie badanej substancji w roztworze można z powodzeniem utrzymywać w obszarze ± 20 % nominalnego lub wstępnie zmierzonego stężenia poprzez okres badania, wtedy wyniki mogą być oparte na wartościach nominalnych lub zmierzonych.

Próbki mogą wymagać przefiltrowania (np. stosując 0,45 μm wymiar poru) lub odwirowania. Odwirowanie jest zalecaną procedurą. Jednakże jeśli badany materiał nie adsorbuje się na filtrze, dopuszczalna jest też filtracja.

W czasie trwania badania powinny być mierzone tlen rozpuszczony, pH i temperatura we wszystkich zbiornikach. Całkowita twardość, alkaliczność i zasolenie (jeśli dotyczy) muszą być mierzone w doświadczeń kontrolnych i w zbiorniku o najwyższym stężeniu. Jako minimum należy pomierzyć rozpuszczony tlen i zasolenie (jeśli dotyczy) trzy razy (na początku, w środku i pod koniec badania). W badaniach półstatycznych jest zalecane, aby rozpuszczony tlen był mierzony częściej, najlepiej przed i po każdej wymianie wody lub co najmniej raz na tydzień. Wartość pH na początku i na końcu każdej wymiany wody w badaniach statycznych odnawialnych i co najmniej cotygodniowo w badaniach przepływowych. Twardość i alkaliczność powinny być mierzone jednorazowo w każdym badaniu. Zalecane jest stałe monitorowanie temperatury w przynajmniej jednym zbiorniku do badań.

1.8.6. **Obserwacje**

Ważenie: pod koniec badania wszystkie ryby, które przeżyły, muszą być zważone jako masa wilgotna (osuszone) albo grupowo z badanego zbiornika albo pojedynczo. Zalecane jest ważenie ryb z badanego zbiornika, zamiast poszczególnych ryb, gdyż wymaga to indywidualnego oznaczenia ryby. W przypadku pomiarów wagi poszczególnych ryb, w celu oznaczenia wskaźnika szczególnego rozwoju określonej ryby, wybrana technika oznaczania powinna zapobiegać stresowaniu zwierząt (alternatywne do oznaczania w stanie zamrożonym jest stosowne oznaczenie ryby np. kolorową cienką linią).

Ryby powinny być sprawdzane codziennie w czasie trwania okresu badania na jakiekolwiek zewnętrzne odstępstwa od normalności (takie jak krwotoki, odbarwienia) oraz nienormalne zachowanie. Każdy przypadek śmiertelny musi być odnotowany, a martwa ryba usunięta tak szybko jak to możliwe. Martwe ryby nie są zastępowane, wskaźnik obciążenia i gęstość wyjściowa są wystarczające, aby zapobiec wpływowi na rozwój poprzez zmiany w ilości ryb na zbiornik. Jednakże zachodzi potrzeba dostosowania wskaźnika żywieniowego.

2. **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

2.1. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Jest zalecane, aby statystyka obejmowała zarówno projekt, jak i analizę badania, ponieważ niniejsza metoda badania pozwala na uwzględnienie znacznej zmiany w projekcie doświadczenia, taką jak na przykład ilość komór do badań, liczbę stężeń badanych, liczbę ryb itd. Uwzględniając dostępne opcje w projekcie badania, nie podano tutaj informacji dotyczących procedur statystycznych.

▼B

Wskaźniki rozwoju nie powinny być obliczane w odniesieniu do zbiorników do badań, gdy śmiertelność przekracza 10 %. Jednakże wskaźnik śmiertelności powinien być wskazany w odniesieniu do wszystkich stężeń badanych.

Którakolwiek metoda jest stosowana do analizy danych, głównym pojęciem jest wskaźnik szczególnego rozwoju r między czasem t_1 i czasem t_2. Może to być określone na kilka sposobów zależnych od tego, czy ryby były indywidualnie oznaczane czy nie albo czy wymagana jest średnia zbiornika.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

gdzie:

r_1 = wskaźnik szczególnego rozwoju określonej ryby,

r_2 = średniego zbiornikowy wskaźnik szczególnego rozwoju,

r_3 = wskaźnik pseudoszczególnego rozwoju,

w_1, w_2 = wagi poszczególnych ryb w czasach odpowiednio t_1 i t_2,

$\log_e w_1$ = logarytm wagi określonej ryby na początku okresu badania,

$\log_e w_2$ = logarytm wagi określonej ryby pod koniec okresu badania,

$\log_e W_1$ = średnia logarytmów wartości w_1 w odniesieniu do ryb w zbiorniku na początku okresu badania,

$\log_e W_2$ = średnia logarytmów wartości w_2 w odniesieniu do ryb w zbiorniku pod koniec okresu badania,

t_1, t_2 = czas (dni) od startu do końca okresu badania

r_1, r_2, r_3 może być obliczony w odniesieniu do okresu 0–28 dni i, tam gdzie to jest stosowne (np. gdy pomiar wykonano w 14 dniu) w odniesieniu do okresów czasu 0–14 i 14–28 dni.

2.1.1. **Regresyjna analiza wyników (modelowanie stężenie-reakcja)**

Niniejsza metoda analizy dostosowuje odpowiednią matematyczną zależność między wskaźnikiem szczególnego rozwoju a stężeniem i stąd umożliwia obliczenie „EC_X”, tj. każdej wymaganej wartości WE. Stosując niniejszą metodę obliczenia r dla określonej ryby (r_1), nie jest konieczne i zamiast tego analiza może być oparta na średniej zbiornikowej wartości r (r_2). Ta ostatnia metoda jest zalecana. Jest także bardziej właściwa w przypadku użycia najmniejszych gatunków.

Średnie zbiornikowe wskaźniki szczególnego rozwoju (r_2) muszą być wykreślone graficznie w zależności od stężenia w celu sprawdzenia zależności reakcji stężenia.

▼B

Dla wyrażenia zależności między r_2 a stężeniem powinien być wybrany właściwy model, a wybór musi być poparty odpowiednim uzasadnieniem.

Jeśli ilości ryb, które przeżyły w każdym zbiorniku są nierówne, wtedy proces dostosowania modelu albo prostego albo nieliniowego powinien być rozważony, aby uwzględnić nierówność rozmiarów grup.

Metoda dostosowania modelu musi umożliwiać oszacowanie czy na przykład EC_{20} i jego rozrzut (czy błąd standardowy czy przedział ufności) może być wyprowadzony. Wykres dopasowanego modelu powinien być przedstawiony w zależności od danych tak, aby odpowiedniość dopasowania modelu była widoczna (8)(18)(29)(20).

2.1.2. **Analiza wyników dla oszacowania LOEC**

Jeżeli badanie obejmuje skopiowane zbiorniki przy wszystkich poziomach stężeń, oszacowanie LOEC może być oparte na analizie wariancji (ANOVA) średniego zbiornikowego wskaźnika szczególnego rozwoju (zob. pkt 2.1), według odpowiednich metod (np. badania Dunnetta lub Williamsa (12)(13)(14)(21)) porównywania średniego r w odniesieniu do każdego stężenia ze średnią r w odniesieniu do doświadczeń kontrolnych dla określenia najniższego stężenia, dla którego ta różnica jest znacząca przy poziomie prawdopodobieństwa 0,05. Jeśli wymagane przyjęcie dla metod parametrycznych nie odpowiada nienormalnemu rozkładowi (np. badanie Shapiro-Wilka) lub heterogenicznej wariancji (badanie Bartletta), należy podjąć rozważania w celu przekształcenia danych do jednolitych wariancji przed zastosowaniem ANOVA albo przeprowadzeniem ważonego ANOVA.

Jeśli badanie nie obejmuje duplikatów zbiorników dla każdego stężenia, ANOVA oparta o zbiorniki będzie niesensytywna albo niemożliwa. W tej sytuacji dopuszczalnym kompromisem jest ANOVA na pseudoszczególnym wskaźniku rozwoju r_3 dla poszczególnych ryb.

Średnia r_3 dla każdego stężenia badanego może wtedy być porównywana ze średnią r_3 dla doświadczeń kontrolnych. LOEC może być wtedy określona jak poprzednio. Trzeba jednak uznać, że niniejsza metoda nie umożliwia wprowadzania poprawek, ani nie zabezpiecza przed zmiennościami między zbiornikami, poza tymi, które są liczone dla zmienności między poszczególnymi rybami. Jednakże doświadczenie pokazało (8), że zmienność między zbiornikami jest bardzo mała w porównaniu z zmiennością wewnątrz zbiorników (tj. między rybami). Jeśli poszczególne ryby nie są włączone do analizy, poboczna metoda identyfikacji i uzasadnienie jej użycia życia muszą być przedstawione.

2.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Wyniki muszą być interpretowane z ostrożnością w przypadku, gdy mierzone stężenie toksykanta w roztworach badanych wypada na poziomie granicy wykrywalności metody analitycznej lub w badaniach półstatycznych, gdy stężenie substancji badanej obniża się między świeżo przygotowanymi roztworami i przed wymianą.

2.3. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

▼B

2.3.1. **Substancja użyta w badaniu:**

— natura fizyczna i odpowiednie właściwości fizykochemiczne,

— dane identyfikacji chemicznej włączając czystość i metodę analityczną kwantyfikacji substancji badanej, tam gdzie jest to stosowne.

2.3.2. **Gatunki użyte w badaniu:**

— możliwie nazwa naukowa,

— szczep, wymiar, dostawca, wszystkie przedtraktowania itp.

2.3.3. **Warunki badania:**

— zastosowana procedura badania (np. półstatyczna/odnawialna, przepływowa, obciążenie, gęstość wyjściowa itp.),

— projekt badania (np. liczba zbiorników do badań, stężenia badane i duplikatów, liczba ryb na zbiornik),

— metoda przygotowania roztworów wyjściowych i częstotliwość odnawiania (środek ułatwiający rozpuszczanie i jego stężenie musi być podane, jeśli jest stosowany),

— nominalne stężenia użyte w badaniu, średnie wielkości mierzonych i ich standardowe odchylenia w zbiornikach do badań metody, którymi je uzyskano, oraz dowody, że pomiary odnoszą się do stężeń substancji badanej w prawdziwym roztworze,

— charakterystyka wody rozcieńczającej: pH, twardość, alkaliczność, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom pozostałości chloru (jeśli jest zmierzony), całkowity węgiel organiczny, zawieszone cząstki stałe, zasolenie ośrodka badanego (jeśli jest zmierzony) oraz każde inne wykonane pomiary,

— jakość wody w obrębie zbiorników do badań: pH, twardość, temperatura i stężenie rozpuszczonego tlenu,

— szczegółowe informacje dotyczące karmienia (np. rodzaj pożywienia, źródło, ilość podawana i częstotliwość).

2.3.4. **Wyniki:**

— dowody, że doświadczenia kontrolne odpowiadają kryteriom ważności dla przeżycia oraz dane śmiertelności zdarzającej się w każdym stężeniu badanym,

— zastosowane techniki statystyczno-analityczne, statystyka oparta na duplikatach lub rybach, opracowanie danych i uzasadnienie użytych technik,

— stabelaryzowane dane wagi średniej i indywidualnej ryb w dniach 0, 14 (jeśli są zmierzone) i 28 wartości średniej zbiornikowej lub pseudoszczególnych wskaźników rozwoju (jeśli to stosowne) w okresie 0–28 dni lub możliwie 0–14 i 14–28,

— wyniki analizy statystycznej (tj. analizy regresyjnej lub ANOVA) zalecane w tabelarycznej i graficznej formie oraz LOEC ($p = 0,05$) i NOEC lub EC_x z, o ile możliwe, błędami standardowymi, jeśli właściwe,

▼B

— wypadki wszystkich niezwykłych reakcji ryb i wszystkie wizualne efekty, wytworzone przez substancję badaną.

3. BIBLIOGRAFIA

(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, pp. 1855–1870.

(4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Hofte 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, pp. 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, pp. 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. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(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, pp. 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, 81 p.

(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, pp. 1096–1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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. 288 pp.

(18) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 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, Minnesota. Tech. Rep. No 05–88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp. 510–531.

▼B

DODATEK 1

GATUNKI RYB ZALECANE DO BADANIA I ODPOWIEDNIE WARUNKI BADANIA

Gatunki	Zalecana temperatura badania zakres temperatur (°C)	Okres naświetlania (godziny)	Zalecany zakres początkowej wagi ryby (g)	Wymagana dokładność pomiarowa	Wskaźnik obciążenia (g/l)	Gęstość wyjściowa (na litr)	Pokarm	Czas trwania badania (dni)
Zalecane gatunki:								
Oncorhynchus mykiss Pstrąg tęczowy	12,5–16,0	12 – 16	1 – 5	100 mg	1,2 – 2,0	4	Sucha pasza dla narybka	≥ 28
Inne dobrze udokumentowane gatunki:								
Danio rerio Zebrafish	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	1 mg	0,2 – 1,0	5 – 10	Żywa żywność *(Brachionus Artemia)*	≥ 28
Oryzias latipes Ricefish (Medaka)	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	1 mg	0,2–1,0	5 – 20	Żywa żywność *(Brachionus Artemia)*	≥ 28

▼B

DODATEK 2

NIEKTÓRE CECHY CHEMICZNE DOPUSZCZONEJ WODY ROZCIEŃCZAJĄCEJ

Substancja	Stężenie
Cząstki stałe	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 mg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 µg/l
Pozostałość chloru	< 10 µg/l
Całkowite pestycydy fosforoorganiczne	< 50 ng/l
Całkowite pestycydy chloroorganiczne plus polichlorowane bifenyle	< 50 ng/1
Calkowity chlor organiczny	< 25 ng/1

▼B

DODATEK 3

Logarytmiczne serie stężeń odpowiednich dla badania toksyczności (9)

Kolumna (liczba stężeń między 100 i 10 lub między 10 i 1) (*)						
1	2	3	i	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	65	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

(*) Serie pięciu (lub więcej) kolejnych stężeń mogą być wybrane z kolumny. Punkt środkowy między stężeniami w kolumnie (x) są znajdowane w kolumnie (2x + 1). Zamieszczone wartości przedstawiają stężenia wyrażone w procentach objętościowo lub wagowo (mg/l lub µg/l). Wartości mogą być zwielokrotniane lub dzielone przez każdą potęgę 10, jeśli to konieczne. Kolumna 1 może być używana, jeśli była znaczna niepewność w poziomie toksyczności.

▼B

C.15. RYBY, KRÓTKOTERMINOWE BADANIE TOKSYCZNOŚCI NA EMBRIONIE I NARYBKU

1. METODA

Niniejsze badanie toksyczności krótkoterminowej jest kopią OECD TG 212 (1998).

1.1. WPROWADZENIE

Niniejsze krótkoterminowe badanie toksyczności na rybim embrionie i narybku jest krótkoterminowym badaniem, w którym etapy życia od świeżo zapłodnionego jaja do końca stadium narybka są poddane ekspozycji. W badaniu tym niewymagane jest karmienie, pod warunkiem że próba zostanie ukończona do momentu, w którym narybek są jeszcze żywione z worka żółtka.

Celem badania jest określenie śmiertelnego i, w ograniczonym zakresie, podśmiertelnego działania substancji chemicznych na szczególne stadia oraz gatunki badane. Niniejsze badanie dostarcza użytecznych informacji, tak że: a) stanowi połączenie między badaniami śmiertelnymi i podśmiertelnymi; b) jest wykorzystywane jako badanie obrazujące dla badania na pełnym wczesnym stadium życia albo dla badań przewlekłej toksyczności; i c) jest wykorzystywane dla badania gatunków w przypadku, gdy techniki gospodarki rolnej nie są wystarczająco zaawansowane do objęcia okresu zmian od stanu endogennego do egzogennego żywienia się.

Należy uwzględnić, że tylko badania obejmujące wszystkie stadia cyklu życia ryby są ogólnie zdolne do dokładnego oszacowania przewlekłej toksyczności substancji chemicznych na ryby oraz że jakiekolwiek zmniejszenie narażenia odnoszące się do etapów życia zmniejsza sensytywność i tak oszacowaną za nisko przewlekłą toksyczność. Dlatego oczekuje się, że badanie na embrionie i narybku będą mniej sensytywne niż badanie na pełnym wczesnym stadium życia, szczególnie w odniesieniu do substancji chemicznych o wysokiej lipofilności (log P_{ow} > 4) oraz substancji chemicznych o szczególnym sposobie toksycznego działania. Jednakże mniejsze różnice w sensytywności między dwoma badaniami są oczekiwane w odniesieniu do substancji chemicznych o nieszczególnym, narkotycznym sposobie działania (1).

Przed publikacją niniejszego badania większość doświadczeń z tym badaniem embrionu i narybka było ze słodkowodną rybą *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae* – zwyczajowa nazwa zebrafish). Bardziej szczegółowe informacje dotyczące przeprowadzania badań dla tego gatunku podano w dodatku 1. Nie wyklucza to użycia innych gatunków, w odniesieniu do których doświadczenie jest również dostępne (tabela 1).

1.2. DEFINICJE

Najniższy obserwowany skutek stężenia (LOEC): jest to najmniejsze badane stężenie substancji badanej, przy której obserwuje się znaczący skutek (przy $p < 0,05$) w porównaniu z doświadczeniem kontrolnym. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC muszą wykazywać szkodliwy skutek, równy lub większy niż ten obserwowany przy LOEC.

Nieobserwowany skutek stężenia (NOEC): jest stężeniem badanym bezpośrednio poniżej LOEC.

▼B

1.3. ZASADA BADANIA

Stadia embrionalne i narybka są eksponowane na zakres stężeń badanej substancji rozpuszczonej w wodzie. W granicach protokołu jest możliwy wybór między procedurami półstatyczną i przepływową. Wybór zależy od natury badanej substancji. Badanie rozpoczyna się od umieszczenia zapłodnionych jaj w komorze do badań i jest kończone zaraz przed tym, gdy worek żółtka jakiejkolwiek larwy w jakiejkolwiek z komór do badań został całkowicie zaabsorbowany lub przed śmiercią głodową rozpoczynającą się w doświadczeniach kontrolnych. Skutki śmiertelne i podśmiertne są oceniane i porównywane z wartościami kontrolnymi w celu ustalenia najniższego obserwowanego skutku stężenia, a stąd nieobserwowanego skutku stężenia. Alternatywnie, mogą być one analizowane, stosując model regresyjny w celu oszacowania stężenia powodującego dany skutek procentowy (tj. LC/ECx, gdzie x jest określony jako skutek %).

1.4. INFORMACJE DOTYCZĄCE SUBSTANCJI UŻYTEJ W BADANIU

Wyniki badania ostrej toksyczności (zob. metoda C.1) najlepiej przeprowadzonego z gatunkami wybranymi do niniejszego badania powinny być dostępne. Wyniki mogą być użyteczne w doborze odpowiedniego zakresu badanych stężeń w badaniu we wczesnym stadium życia. Rozpuszczalność w wodzie (łącznie z rozpuszczalnością w wodzie badanej) i ciśnienie pary badanej substancji powinny być znane. Powinna być dostępna wiarygodna metoda analityczna do oznaczania ilościowego substancji w roztworach badanych ze znaną i udokumentowaną dokładnością oraz granicą wykrywalności.

Informacje dotyczące substancji badanej, które są przydatne w ustaleniu warunków badania, obejmują wzór strukturalny, czystość substancji, stabilność w wodzie i na świetle, pKa, P_{ow} i wyniki badania całkowitej biodegradacji (zob. metoda C.4).

1.5. WAŻNOŚĆ BADANIA

Aby badanie było ważne, mają zastosowanie następujące warunki:

— całkowite przeżycie zapłodnionych jaj w doświadczeniach kontrolnych, a tam gdzie to jest odpowiednie – w zbiornikach tylko rozpuszczalnikowych, musi być większe niż lub równe granicom określonym w dodatkach 2 oraz 3,

— stężenie tlenu rozpuszczonego musi wynosić między 60 a 100 % wartości nasycenia powietrzem (ASV) w trakcie badania,

— temperatura wody nie może się różnić więcej niż ± 1,5°C między komorami do badań lub między kolejnymi dniami w dowolnym momencie podczas trwania badania i powinno być w granicach zakresu temperatur, określonego w odniesieniu do badanych gatunków (dodatki 2 i 3).

▼B

1.6. OPIS METODY BADANIA

1.6.1. **Komory do badań**

Można użyć jakiekolwiek szklane i inne obojętne chemicznie zbiorniki. Wymiary zbiorników muszą być dostatecznie duże, aby zapewnić zgodność ze wskaźnikiem obciążenia (zob. pkt 1.7.1.2). Jest zalecane, aby komory do badań były losowo rozmieszczone w obszarze badania. Losowo zaprojektowany blok z traktowaniem w każdym bloku jest zalecane do całkowicie losowo wybranego projektu, gdy występują systematyczne skutki w laboratorium, które mogą być skontrolowane poprzez wykorzystanie blokowania. Blokowanie, jeśli jest wykorzystane, powinno być uwzględnione w późniejszej analizie danych. Komory do badań powinny być ekranowane od niepożądanych zakłóceń.

1.6.2. **Wybór gatunków ryb**

Zalecane gatunki ryb podano w tabeli 1A. To nie wyklucza wykorzystania innych gatunków (przykłady podano w tabeli 1B), ale procedura badania musi być dostosowana w celu zapewnienia odpowiednich warunków badania. W tym przypadku należy podać racjonalne uzasadnienie dla wyboru gatunku i metody doświadczalnej.

1.6.3. **Utrzymanie wylęgu ryb**

Szczegółowe informacje dotyczące utrzymania wylęgu wyjściowego w zadawalających warunkach można znaleźć w OECD TG 210 ([1]) i w bibliografii (2)(3)(4)(5)(6).

1.6.4. **Postępowanie z embrionami i larwami**

Embriony i larwy poddawane są wystawianie na badanie w obrębie głównego zbiornika, w mniejszych zbiornikach wyposażonych w siatki po bokach lub na końcach, pozwalające na przepływ roztworu badanego przez zbiornik. Nieburzliwy przepływ przez te małe zbiorniki jest powodowany przez zanurzanie ich za pomocą ramienia poruszającego zbiornik w górę i w dół, ale utrzymującego zawsze organizmy w zanurzeniu; można wykorzystać także system syfonowopłuczący. Zapłodnione jaja łososiowatych ryb są podpierane na półkach lub siatkach ze szczelinami wystarczająco dużymi, by umożliwić larwom spadanie przez nie po wylęgu. Użycie pasteryzowanych pipet jest właściwe do usunięcia embrionów i larw w badaniach półstatycznych z całkowitym odnawianiem codziennym (zob. pkt 1.6.6).

W przypadku gdy pojemniki na jaja, siatki albo oczka używano do utrzymywania jaj wewnątrz głównego zbiornika do badań, umocowania te powinny być usunięte po wylęgu larw ([1]), poza zachowaniem oczek zapobiegających ucieczce ryb. Jeśli zachodzi konieczność przeniesienia larw, nie można ich wystawiać na powietrze i nie wolno używać sieci do wypuszczania ryb z pojemników jaj (taka ostrożność nie jest konieczna dla trochę mniej delikatnych gatunków, np. karpia). Czas takiego przeniesienia zmienia się w zależności od gatunku i przeniesienia nie zawsze są konieczne. Dla techniki półstatycznej można stosować zlewki lub płytkie pojemniki, a jeśli konieczne – wyposażone w ekran z oczkami, nieznacznie podniesiony powyżej dna zlewki. Jeśli objętość tych pojemników jest wystarczająca do zapewnienia wymagań obciążenia (zob. 1.7.1.2), nie jest konieczne przenoszenie embrionów lub larw.

([1]) OECD, Paris, 1992. Test Guideline 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test.

▼B

1.6.5. **Woda**

Każda woda, która odpowiada chemicznym cechom akceptowalnej wody rozcieńczającej, jak wymieniono w dodatku 4, i w której badane gatunki wykazują przeżycie w doświadczeniu kontrolnym, co najmniej tak dobre jak te opisane w dodatkach 2 i 3, może być stosowana jako woda do badań. Powinna być stałej jakości w okresie trwania badania. Wartość pH wody powinna pozostawać w zakresie ± 0,5 jednostek pH. W celu zapewnienia, aby rozcieńczająca woda nie miała falowego wpływu na wyniki badania (np. przez kompleksowanie substancji badanej) lub negatywnego działania na przeprowadzenie wylęgu wyjściowego, należy okresowo pobierać próbki wody do analizy. Co trzy miesiące, na przykład, powinny być dokonane pomiary metali ciężkich (takich jak Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca, Mg, Na, K, Cl i SO_4), pestycydów (np. całkowita ilość fosforo- i chloroorganicznych), całkowitych węgli organicznych i zawiesin ciał stałych, w przypadku gdy rozcieńczająca woda jest znana jako stosunkowo stała w jakości. Jeśli można przedstawić dane, że jakość wody była stała przynajmniej przez rok, oznaczenia mogą być mniej częste a przedziały rozszerza się (np. co sześć miesięcy).

1.6.6. **Roztwory stosowane w badaniu**

Roztwory w badaniu o wybranym stężeniu są przygotowywane poprzez rozcieńczanie roztworu podstawowego.

Zalecane jest przygotowanie roztworu podstawowego przez proste wymieszanie badanej substancji w wodzie rozcieńczającej w sposób mechaniczny (np. mieszadło lub ultradźwięki). Kolumny nasyceniowe (rozpuszczające) stosuje się do uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. W najszerszym możliwym zakresie należy unikać stosowania rozpuszczalników lub dyspergatorów; jednakże takie związki mogą być wymagane w kilku przypadkach w celu wykonania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Przykładami odpowiednich rozpuszczalników są aceton, etanol, metanol, dimetylosulfotlenek, dimetyloformamid i glikol trójetylenowy. Przykładami odpowiednich dyspergatorów są Cremophor RH40, Tween 80, metyloceluloza 0,01 % i HCO-40. Należy zachować ostrożność przy użyciu łatwo biodegradowalnych środków (np. aceton) i/lub wysokolotnych związków, gdyż mogą być przyczyną problemów z rozwojem bakterii w przepływach badań. Gdy stosuje się środki rozpuszczające, nie mogą one mieć znaczącego wpływu na przeżycie i widocznych negatywnych działań na wczesne stadium życia, jak odkryto przy doświadczeniu kontrolnym z rozpuszczalnikiem. Jednakże należy dołożyć wszelkich starań, aby zapobiec stosowaniu takich materiałów.

W odniesieniu do techniki półstatycznej mogą być prowadzone dwie różne procedury odnawiania; albo (i) nowe roztwory badane są przygotowywane w czystych zbiornikach, a jaja i larwy, które przeżyły, są delikatnie przenoszone do nowych zbiorników w małej objętości starego roztworu, zapobiegając ekspozycji na działanie powietrza; albo (ii) organizmy badane są utrzymywane w zbiornikach, o ile proporcja (co najmniej trzy czwarte) wody badanej jest zmieniona. Częstotliwość odnawiania ośrodka zależy od stabilności substancji badanej, lecz zalecane jest codzienne odnawianie wody. Jeśli z badań stabilności pierwotnej (zob. pkt 1.4) wynika, że stężenie substancji badanej nie jest stabilne (tj. poza zakresem nominalnego 80–120 % lub spada poniżej 80 % zmierzonego stężenia początkowego) ponad okres odnowienia, należy rozważyć celowość użycia badania przepływowego. W każdym przypadku należy zachować ostrożność, aby zapobiec stresom dla larw w trakcie czynności odnawiania wody.

▼B

W odniesieniu do badań przepływowych wymagany jest system ciągłego dozowania i rozcieńczania roztworu podstawowego substancji badanej (np. pompa dozująca, rozcieńczalnik proporcjonalny, system nasycania) do przesyłania serii stężeń do komór do badań. Szybkości przepływów roztworu podstawowego i rozcieńczającej wody powinny być sprawdzane okresowo, najlepiej codziennie w trakcie trwania badania, oraz nie powinny zmieniać się więcej niż 10 % w trakcie badania. Jako odpowiedni uznano wskaźnik przepływu równoważny co najmniej pięciu objętościom komory w ciągu 24 godzin (2).

1.7. PROCEDURA

Przydatne informacje dotyczące przeprowadzania na rybich embrionach i narybku badań toksyczności jest dostępna w literaturze, której kilka przykładów jest włączone do części bibliograficznej niniejszego tekstu (7)(8)(9).

1.7.1. **Warunki ekspozycji**

1.7.1.1. *Czas trwania*

Badanie powinno rozpocząć się w ciągu 30 minut po zapłodnieniu jaj. Embriony są zanurzane w roztworze badanym przed lub, tak szybko jak to możliwe, po rozpoczęciu stadium rozszczepienia tarczek zarodowych, a w każdym przypadku przed rozpoczęciem stadium gastruli. W odniesieniu do jaj uzyskanych od dostawcy handlowego niemożliwe jest rozpoczęcie badania niezwłocznie po zapłodnieniu. Ponieważ na sensytywność badania poważnie wpływa opóźnienie rozpoczęcia badania, badanie powinno być zapoczątkowane w ciągu ośmiu godzin po zapłodnieniu. Ponieważ larwy nie są karmione w czasie trwania okresu ekspozycji, badanie musi być zakończone w chwili, zanim woreczek żółtkowy jakiejkolwiek larwy w którejkolwiek z komór zostanie całkowicie zaabsorbowany lub przed początkiem śmierci głodowej w doświadczeniach kontrolnych. Czas trwania zależy od wykorzystanych gatunków. Kilka zalecanych czasów trwania podano w dodatku 2 i 3.

1.7.1.2. *Obciążenie*

Liczba zapłodnionych jaj na początku badania musi być wystarczająca, aby spełnić wymagania statystyczne. Powinny być one losowo rozdzielone między zabiegami, po co najmniej 30 zapłodnionych jaj, rozdzielonych równo (lub tak równo jak to możliwe, ponieważ jest trudne uzyskanie równych partii przy użyciu niektórych gatunków) między co najmniej trzy skopiowane komory do badań używane na jedno stężenie. Wskaźnik obciążenia (biomasa na objętość roztworu badanego) powinien być wystarczająco niski, aby stężenie rozpuszczonego tlenu wynosiło co najmniej 60 % ASV i mogło być utrzymane bez napowietrzania. W odniesieniu do badań przepływowych wskaźnik obciążenia nieprzekraczający 0,5 g/l na 24 godziny i nieprzekraczający 5 g/l roztworu w dowolnym momencie są zalecane (2).

1.7.1.3. *Światło i temperatura*

Okres naświetlania i temperatura wody badanej musi być właściwa dla badanego gatunku (dodatek 2 i 3). W celu monitorowania temperatury właściwe jest użycie dodatkowego zbiornika do badań.

▼B

1.7.2. **Stężenia użyte w badaniu**

Zwykle wymagane jest pięć stężeń do badań w odstępie o stały wskaźnik nieprzekraczający 3,2. Przy wyborze zakresu stężeń badanych w badaniach toksyczności ostrej należy wziąć pod uwagę krzywą zależności LC_{50} od okresu ekspozycji. Użycie mniej niż pięciu stężeń, na przykład w badaniach granicznych i węższego odstępu stężenia, w pewnych okolicznościach może być właściwe. Jeżeli użyto mniej niż pięciu stężeń powinno być dostarczone uzasadnienie. Stężenie substancji wyższe niż 96 godzin LC_{50} lub 100 mg/l, którekolwiek jest niższe, nie wymaga badania. Najwyższe stężenie badane nie może przekraczać granicy rozpuszczalności substancji w wodzie.

W przypadku gdy środek ułatwiający rozpuszczenie jest wykorzystany w przygotowaniu roztworów badanych (zob. pkt 1.6.6), jego końcowe stężenie nie może być większe niż 0,1 ml/l i zalecane jest takie same we wszystkich zbiornikach do badań.

1.7.3. **Doświadczenia kontrolne**

Jedno doświadczenie kontrolne z wodą rozcieńczającą (powtórzona odpowiednio), a także, jeśli jest to stosowne, jedno doświadczenie kontrolne ze środkiem ułatwiającym rozpuszczanie (powtórzone odpowiednio) powinno być dodatkowo przeprowadzone obok serii badań.

1.7.4. **Częstotliwość oznaczeń analitycznych i pomiarów**

W czasie trwania badania stężenia substancji badanej są oznaczane w regularnych odstępach czasu.

W półstatycznych (odnawialnych) badaniach, w przypadku gdy oczekuje się że stężenie substancji utrzyma się w zakresie ± 20 % nominalnego (tj. w zakresie 80–120 %; zob. pkt 1.4, i 1.6.6), jest zalecane, aby jako minimum analizować najniższe i najwyższe stężenia badane świeżo po przygotowaniu i zaraz przed odnowieniem, następnie w co najmniej trzech przypadkach oddzielonych równo poprzez badanie (tj. analizy powinny być wykonywane na próbce z tego samego roztworu – świeżo przygotowanym i przy wymianie).

W odniesieniu do badań, w których nie oczekuje się, że stężenie substancji badanej pozostanie w zakresie ± 20 % nominalnego (na bazie danych stabilności substancji) niezbędne jest analizowanie wszystkich badanych stężeń, świeżo po przygotowaniu i przy wymianie, zgodnie z tymi samymi warunkami (tj. w co najmniej trzech przypadkach oddzielonych równo poprzez badanie). Oznaczanie stężenia substancji badanej przed wymianą wymagane jest tylko na jednej z kopii zbiornika przy każdym stężeniu badanym. Oznaczenia powinny być dokonywane nie częściej niż co siedem dni. Zalecane jest, aby wyniki oparte były na pomierzonych stężeniach. Jeżeli jednakże dostępne dowody są zdolne wykazać, że stężenie badanej substancji w roztworze zostało z powodzeniem utrzymane w zakresie ± 20 % nominalnego lub wstępnie zmierzonego stężenia, poprzez okres badania, wtedy wyniki mogą być oparte na początkowych wartościach nominalnych lub zmierzonych.

W odniesieniu do badań przepływowych właściwe jest użycie podobnego do opisanego dla badań półstatycznych, sposobu pobierania próbek (lecz pomiar „starych” roztworów nie jest stosowany w tym przypadku). Jednakże gdy czas trwania badania jest dłuższy niż siedem dni, wskazane jest podniesienie ilości pobieranych próbek podczas pierwszego tygodnia (np. trzy zestawy pomiarów) w celu zapewnienia aby stężenia badane pozostały stałe.

▼B

Próbki mogą wymagać odwirowania lub przefiltrowania (np. stosując 0,45 μm wymiar poru). Jednakże ani odwirowanie, ani filtracja nie skutkują zawsze rozdzieleniem frakcji niebioprzyswajalnej substancji badanej od tej, która jest bioprzyswajalna, zatem próbki nie mogą być przedmiotem takiego przetwarzania.

W czasie trwania badania tlen rozpuszczony, pH oraz temperatura powinny być mierzone we wszystkich zbiornikach do badań. Całkowita twardość i zasolenie (jeśli dotyczy) powinny być mierzone w doświadczeniach kontrolnych i w zbiorniku o najwyższym stężeniu. Jako minimum należy pomierzyć rozpuszczony tlen i zasolenie (jeśli dotyczy) trzy razy (na początku, w środku i na koniec badania). W badaniach półstatycznych jest zalecane, aby rozpuszczony tlen był mierzony częściej, najlepiej przed i po każdej wymianie wody lub co najmniej raz na tydzień. Wartość pH na początku i na końcu każdej wymiany wody w badaniach statycznych odnawialnych i co najmniej cotygodniowo w badaniach przepływowych. Twardość powinna być zmierzona jednorazowo w każdym badaniu. Temperatura powinna być mierzona codziennie i zalecane jest stałe monitorowanie temperatury w przynajmniej jednym zbiorniku do badań.

1.7.5. **Obserwacje**

1.7.5.1. *Stadium rozwoju embrionalnego*

Stadium embrionalne (tj. stadium gastruli) na początku ekspozycji na działanie substancji badanej powinno być sprawdzone tak dokładnie jak to możliwe. Można tego dokonać stosując reprezentatywną próbkę jaj odpowiednio zabezpieczonych i przezroczystych. Można również uwzględnić literaturę w odniesieniu do opisu i ilustracji stadiów embrionalnych (2)(5)(10)(11).

1.7.5.2. *Wylęg i przeżycie*

Obserwacje w zakresie wylęgania i przeżycia powinny być dokonywane co najmniej raz dziennie, a liczby powinny być zarejestrowane. Pożądane może być częstsze dokonywanie obserwacji na początku badania (np. co 30 minut w ciągu trzech pierwszych godzin), ponieważ w kilku przypadkach czas przeżycia jest bardziej istotny od jedynie liczby zgonów (np. gdy występują skutki ostrej toksyczności). Martwe embriony i larwy powinny być usunięte natychmiast po zauważeniu, gdyż gwałtownie się rozkładają. Należy zachować najwyższą ostrożność przy usuwaniu martwych osobników, aby nie stłuc lub fizycznie uszkodzić przylegających jaj/larw, które są bardzo delikatne i wrażliwe. Kryteria dotyczące zgonu zmieniają się według stadium życia:

— **w odniesieniu do jaj:** szczególnie we wczesnym stadium znacząca strata przezroczystości i zmiany w zabarwieniu spowodowane przez koagulację i/lub strącania białek prowadzące do białego, nieprzezroczystego wyglądu,

— **w odniesieniu do embrionów:** zanik ruchu organów i/lub uderzeń serca i/lub nieprzezroczyste odbarwienie dla gatunków, które są zwykle przezroczyste,

— **w odniesieniu do larw:** nieruchomość i/lub brak ruchu oddechowego i/lub brak bicia serca i/lub białe nieprzezroczyste zabarwienie centralnego systemu nerwowego i/lub brak reakcji na bodźce mechaniczne.

▼B

1.7.5.3. *Anormalny wygląd*

Liczba larw wykazujących anormalności w kształcie ciała i/lub pigmentacji, stadium absorpcji żółtko-torba powinny być rejestrowane w odpowiednich odstępach czasu zależnych od czasu trwania badania i charakteru opisanej nienormalności. Należy zauważyć, że anormalne embriony i larwy zdarzają się w naturalny sposób i w doświadczeniu(-ach) kontrolnym(-ych) może ich być rzędu kilku procent w jakimś gatunku. Anormalne zwierzęta powinny być jedynie usunięte ze zbiorników do badań i zabite.

1.7.5.4. *Anormalne zachowanie*

Abnormalności, np. hiperwentylacja, nieskoordynowane pływanie i nietypowy spokój powinny być zarejestrowane w odpowiednich odstępach czasu zależnych od czasu trwania badania. Skutki te, choć trudne do określenia ilościowego, gdy są obserwowane, pomagają w interpretacji danych dotyczących śmiertelności, tj. dostarczają informacji dotyczących sposobu toksycznego działania substancji.

1.7.5.5. *Długość*

Na koniec badania zalecany pomiar indywidualnych długości; można zastosować standardową, widełkową lub całkowitą długość. Jeśli jednakże występuje ogonowe gnicie płetwy lub nadżerka, należy zastosować długość nominalną. Ogólnie, w dobrze przebiegającej próbie współczynnik rozrzutu długości między kopiami w doświadczeniach kontrolnych powinien wynosić ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Waga*

Na koniec badania, mierzona może być waga indywidualna; bardziej pożądana jest sucha waga: (24 h w 60 ^{o}C) od wilgotnej wagi (suszenie bibułą). Ogólnie, w dobrze przebiegającej próbie współczynnik rozrzutu wagi między kopiami w doświadczeniach kontrolnych powinien wynosić ≤ 20 %.

Obserwacje te wynikają z niektórych lub ze wszystkich następujących danych dostępnych dla analizy statystycznej:

— skumulowana śmiertelność,

— liczba zdrowych larw na koniec badania,

— czas rozpoczęcia wylęgu i czas zakończenia wylęgu (tj. 90 % wylęgu w każdej kopii),

— ilość larw wylęgających się każdego dnia,

— długość (i waga) zwierząt, które przeżyły na koniec badania,

— ilość larw zdeformowanych lub o anormalnym wyglądzie,

— ilość larw wykazujących anormalne zachowanie.

▼B

2. **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

2.1. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Jest zalecane, aby statystyka była włączona w projekt jak i analizę badania, ponieważ niniejsza metoda badania umożliwia uwzględnienie znacznej zmiany w projekcie doświadczenia, taką jak na przykład ilość komór do badań, liczbę stężeń badanych, liczbę zapłodnionych jaj i zmierzone parametry. Uwzględniając dostępne opcje w projekcie badania, nie podano tutaj informacji dotyczących procedur statystycznych.

Jeśli LOEC/NOECs mają być oszacowane niezbędne jest w odniesieniu do zmienności analizowanych między każdym zestawem kopii, zastosowanie analizy wariancji (ANOVA) lub procedury tablicy wielodzielczej. W celu wykonania wielokrotnego porównania między wynikami dla poszczególnych stężeń i tych dla doświadczeń kontrolnych metoda Dunnetta jest uznana za użyteczną (12)(13). Inne przydatne przykłady są także dostępne (14)(15). Rozmiar skutku wykrywalnego przy użyciu ANOVA lub innych procedur (tj. moc badania) powinna być obliczona i przedstawiona. Należy odnotować, że nie wszystkie obserwacje wymienione w pkt 1.7.5.6 są odpowiednie do analizy statystycznej przy zastosowaniu ANOVA. Na przykład skumulowana śmiertelność i liczba zdrowych larw na końcu badania są analizowane przy wykorzystaniu metod probitowych.

Jeśli LC/EC_xs mają być oszacowane, odpowiednia(-e) krzywa(-e), takie jak krzywa logistyczna, muszą być dopasowane do interesujących danych, stosując metodę statystyczną taką jak najmniejszych kwadratów lub nieliniową najmniejszych kwadratów. Krzywa(-e) powinna(-y) być parametryzowana(-e) tak, aby interesujące LC/EC_x oraz jego błąd standardowy były szacowane bezpośrednio. To znacznie ułatwia obliczenie granic ufności wokół LC/EC_x. Pod warunkiem, że nie ma słusznych przyczyn, należy zalecać poziomy ufności dwustronne, o założonej 95 % ufności. Zalecane jest, aby procedura dopasowania dostarczała sposoby w zakresie oceniania znaczenia braku dopasowania. Stosuje się graficzne metody dla dopasowania krzywych. Analiza regresyjna jest odpowiednia w odniesieniu do wszystkich obserwacji wymienionych w pkt 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Wyniki powinny być interpretowane z ostrożnością w przypadku, gdy mierzone stężenie toksykanta w roztworach badanych oscyluje na poziomie granicy wykrywalności metody analitycznej. Interpretacja wyników w odniesieniu do stężeń powyżej rozpuszczalności substancji w wodzie również powinna być dokonywana z ostrożnością.

2.3. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

2.3.1. **Substancja użyta w badaniu:**

— charakter fizyczny i odpowiednie właściwości fizykochemiczne,

— dane identyfikacji chemicznej włączając czystość i metodę analityczną kwantyfikacji substancji badanej tam gdzie to jest właściwe.

▼B

2.3.2. **Gatunki użyte w badaniu:**

— nazwa naukowa, szczep, liczba rodzicielskich ryb (tj. ile samic użyto do dostarczenia żądanej ilości jaj do badań), źródło i metodę zbierania zapłodnionych jaj i dalsze postępowanie.

2.3.3. **Warunki badania:**

— zastosowana procedura testowa (np. półstatyczna lub przepływowa, okres czasu od zapłodnienia do rozpoczęcia badania, obciążenie itp.),

— okres(-y) naświetlania,

— projekt badania (np. liczba komór do badań i kopii, liczba embrionów na kopię, stężenia badane i w kopiach, liczba ryb na zbiornik),

— metoda przygotowania roztworów wyjściowych i częstotliwość odnawiania (środek ułatwiający rozpuszczanie i jego stężenie powinny być podane, jeśli jest zastosowany),

— nominalne stężenia badane, średnie wielkości mierzonych i ich standardowe odchylenia w zbiornikach do badań metody, którymi je uzyskano oraz dowody, że pomiary odnoszą się do stężeń substancji badanej w roztworze,

— cechy wody rozcieńczającej: pH, twardość, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom pozostałości chloru (jeśli jest zmierzony), całkowity węgiel organiczny, zawieszone cząstki stałe, zasolenie ośrodka badanego (jeśli jest zmierzone) oraz wszelkie inne wykonane pomiary,

— jakość wody w zbiornikach do badań: pH, twardość, temperatura i stężenie rozpuszczonego tlenu.

2.3.4. **Wyniki:**

— wyniki ze wszystkich wstępnych badań stabilności badanej substancji,

— dowody, że doświadczenia kontrolne odpowiadają kryteriom ważności w odniesieniu do przeżycia badanych gatunków (dodatki 2 i 3),

— dane dotyczące śmiertelności/przeżycia na stadiach embrionu i larwy oraz całkowita śmiertelność/przeżycie,

— dni do wylęgu i liczba wylęgłych,

— dane dotyczące długości (i wagi),

— zasięg i opis morfologicznych anormalności, jeśli istnieją,

— zasięg i opis efektów zachowania, jeśli istnieją,

— analiza statystyczna i opracowanie danych,

— w odniesieniu do badań analizowanych przy pomocy ANOVA, najniższy obserwowany skutek stężenia (LOEC) przy $p = 0,05$ i nieobserwowany skutek stężenia (NOEC) w odniesieniu do każdej ocenianej reakcji, włączając opisanie procedur statystycznych użytych do wskazania wymiaru skutku wykrywalnego,

▼B

— w odniesieniu do badań analizowanych przy użyciu technik regresyjnych, LC/ECx i przedziałów ufności wraz z wykresem dopasowanego modelu stosowanego dla ich wyliczenia,

— wyjaśnienie dotyczące każdego odchylenia od niniejszej metody badania.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(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, 60 pp. 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. 26 pp.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 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. p. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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. 36 pp.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096–1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 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, pp. 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, 81 pp.

(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, pp. 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: pp. 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, pp. 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., Mclntyre 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, pp. 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, 280 pp.

(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, pp. 1–58.

Tabela 1A

Gatunki ryb zalecane do badania

SŁODKOWODNE
Oncorhynchus mykiss
Pstrąg tęczowy (9)(16)
Danio rerio
Danio pręgowany (7)(17)(18)
Cyprinus caprio
Karp zwykły (8)(19)
Oryzias latipes
(20)(21)
Pimephales promelas
(8)(22)

▼B

Tabela 1B

Przykłady innych dobrze udokumentowanych gatunków, które również zostały użyte

SŁODKOWODNE	SŁONOWODNE
Carassius auratus Karaś srebrzysty (8)	*Menidia peninsulae* (23)(24)(25)
Lepomis macrochirus (8)	*Clupea harengus* Śledź (24)(25)
	Gadus morhua Dorsz (24)(25)
	Cyprinodon variegatus (23)(24)(25)

▼B

DODATEK 1

WSKAZÓWKI DOTYCZĄCE PROWADZENIA BADANIA TOKSYCZNOŚCI NA EMBRIONACH I NARYBKU RYBY DANIO PRĘGOWANY *(BRACHYDANIO RERIO)*

WPROWADZENIE

Danio pręgowany pochodzi z wybrzeża Coromandel w Indiach, gdzie zamieszkuje szybko płynące strumienie. Jest to zwykła akwaryjna ryba z rodziny karpiowatych, a informacje na temat procedur opieki nad nią i hodowaniu można znaleźć w publikacjach informacyjnych o tropikalnych rybach. Jej biologia i badania łowisk zostały przedstawione przez Laale (1).

Ryba rzadko przekracza 45 mm długości. Ciało jest cylindryczne z 7–9 ciemnoniebieskimi poziomymi srebrzystymi pasami. Pasy te przebiegają przez ogon i płetwy odbytowe. Grzbiet jest oliwkowozielony. Samce są szczuplejsze od samic. Samice są bardziej srebrzyste i ich odwłok jest rozszerzony, szczególnie przed tarłem.

Dorosłe ryby są w stanie tolerować duże wahania temperatur, pH i twardości. Jednakże w celu uzyskania zdrowej ryby produkującej jaja dobrej jakości, powinny być zapewnione optymalne warunki.

W czasie trwania tarła samiec ściga i bodzie samicę i jak tylko jaja zostaną wyrzucone, zapładnia je. Jaja, które są przezroczyste i nieklejące, opadają na dno, gdzie są zjadane przez dorosłe ryby. Światło wpływa na tarło. Jeśli poranne światło jest odpowiednie, ryby trą się we wczesnych godzinach poprzedzających świt.

Samice produkują partie kilkuset jaj w odstępach tygodniowych.

WARUNKI RYB RODZICIELSKICH, ROZMNAŻANIE I WCZESNE STADIA ŻYCIA

Należy wybrać odpowiednią liczbę zdrowych ryb i trzymać je w odpowiedniej wodzie (np. dodatek 4) przynajmniej dwa tygodnie przed zamierzonym tarłem. Grupie ryb należy pozwolić rozmnażać się co najmniej raz, przed utworzeniem partii jaj używanych w badaniu. Gęstość zarybienia w czasie trwania tego okresu nie może przekraczać 1 gram ryby na jeden litr. Regularne zmiany wody lub użycie systemów oczyszczania umożliwia zastosowanie wyższej gęstości. Temperatura wody w zbiornikach przetrzymujących powinna być utrzymana na poziomie 25 ± 2 ^{o}C. Rybom należy dostarczyć różnorodną dietę, która składa się na przykład z handlowej suchej karmy, żywych świeżo wylęgniętych *Arthemia*, ochotkowatych, *Daphnii*, białych robaków (*Enchytraeids*).

Poniżej określono dwie procedury, które w praktyce doprowadziły do dostatecznej partii zdrowych, zapłodnionych jaj dla prowadzenia badania:

(i) Osiem samic i szesnaście samców jest umieszczanych w zbiorniku zawierającym 50 litrów wody rozcieńczającej, osłonięte od bezpośredniego światła i pozostawione tak długo jak to możliwe niezakłócenie przez co najmniej 48 godzin. Tackę na ikrę umieszczono na dnie akwarium, po południu dnia przed startem badania. Tacka na ikrę składa się z ramy (pleksiglas lub inny odpowiedni materiał), o 5–7 cm wysokości z 2–5 mm grubą siatką dołączoną na górze i 10–30 μm drobną siatką na dnie. Pewna liczba „drzew ikrowych" składających się z nieskręconej nylonowej liny jest dołączona do grubej siatki ramy. Po pozostawieniu ryb przez 12 godzin w ciemności włącza się słabe światło, które zapoczątkowuje tarło. Dwie do czterech godzin po tarle tacka na ikrę jest wyjmowana i jaja są zbierane. Tacka na ikrę zapobiega zjedzeniu jaj przez ryby i w tym samym czasie pozwala na łatwe zbieranie jaj. Grupa ryb powinna co najmniej raz trzeć się, przed tarłem z którego jaja są wykorzystywane do badań.

▼B

(ii) Pięć do dziesięciu rybich samców i samica są umieszczone oddzielnie na co najmniej dwa tygodnie przed planowanym tarłem. Po 5–10 dniach odwłoki samic będą poszerzone i ich rodne brodawki widoczne. Samce nie posiadają brodawek. Tarło jest przeprowadzane w zbiornikach do tarła wyposażonych w fałszywe dno z siatki (jak wyżej). Zbiornik jest napełniany wodą rozcieńczającą, tak aby głębokość wody powyżej siatki wynosiła 5–10 cm. Jedna samica i dwa samce są umieszczane w zbiorniku na dzień przed planowanym tarłem. Temperatura wody jest stopniowo podnoszona do poziomu wyższego niż temperatura aklimatyzacji. Światło jest wyłączane i zbiornik pozostaje w możliwym zakresie w niezakłóconym stanie. Rano włącza się słabe światło, które zapoczątkowuje tarło. Po 2–4 godzinach ryby są usuwane, a jaja zbierane. Jeśli potrzebne są większe partie jaj, uzyskuje się je od jednej samicy, dostateczna ilość zbiorników do tarła zostaje podłączona równolegle. Poprzez rejestrowanie sukcesu reprodukcyjnego indywidualnych samic przed badaniem (wielkość i jakość partii) samice z najwyższym sukcesem reprodukcyjnym są wybierane do hodowli.

Jaja powinny być przeniesione do zbiorników do badań za pomocą szklanych rurek (o wewnętrznej średnicy nie mniej niż 4 mm) zaopatrzonych w elastyczną cebulkę ssącą. Ilość wody towarzysząca jajom przy ich przenoszeniu powinna być tak niewielka, na ile to możliwe. Jaja są cięższe niż woda i opadają w rurce. Należy zachować ostrożność, aby zapobiec kontaktowi jaj (i larw) z powietrzem. Należy wykonać badania mikroskopowe próbki(-ek) z partii w celu zapewnienia, aby nie posiadały one żadnych nieregularności w pierwszym stadium rozwojowym. Dezynfekcja jaj jest niedopuszczalna.

Wskaźnik śmiertelności jaj jest najwyższy w pierwszych 24 godzinach po zapłodnieniu. Śmiertelność 5–40 % obserwowana jest często w trakcie trwania tego okresu. Jaja degenerują się jako wynik niedostatecznego zapłodnienia lub wad rozwojowych. Jakość partii jaj wydaje się zależna od samic, chociaż niektóre samice produkują konsekwentnie jaja dobrej jakości, jakiej inne nigdy nie dają. Także wskaźnik rozwoju i wskaźnik wylęgu zmienia się od jednej partii do drugiej. Zapłodnione z powodzeniem jaja i pęcherzyki żółtkowe larw przeżywają na wysokim poziomie, zwykle powyżej 90 %. Przy 25 ^{o}C jaja wylęgają sie 3–5 dni po zapłodnieniu i woreczek żółtkowy absorbuje się około 13 dni po zapłodnieniu.

Rozwój embrionalny został dobrze określony przez Hisaoka i Battle (2). Dzięki przejrzystości jaj i larw powylęgowych obserwuje się postępujący rozwój ryby oraz występowanie zniekształceń. W około cztery godziny po tarle niezapłodnione jaja są odróżnialne od zapłodnionych (3). Dla sprawdzenia tego, jaja i larwy są umieszczane w zbiornikach do badań o małej objętości i są obserwowane pod mikroskopem.

Warunki badania mającego zastosowanie do wczesnych stadiów życia są zamieszczone w dodatku 2. Optymalne wartości pH i twardości wody wynoszą odpowiednio 7,8 i 250 mg $CaCO_3$/l.

OBLICZENIA I STATYSTYKI

Proponowane jest podejście dwuetapowe. Najpierw dane dotyczące śmiertelności, nienormalny rozwój i czas wylęgu są analizowane statystycznie. Następnie, w odniesieniu do tych stężeń, przy których nie ma skutków negatywnych żadnego z tych rejestrowanych parametrów, ocenia się statystycznie długość ciała. Niniejsze podejście jest wskazane, gdyż toksykant może zabijać selektywnie mniejsze ryby, opóźniać czas wylęgu i powodować znaczne zniekształcenia, prowadząc w ten sposób do błędnych pomiarów długości. Ponadto jest to z grubsza ta sama ilość ryb zmierzonych do poddania traktowaniu, zapewniając ważność statystyki badania.

▼B

OKREŚLENIA LC_{50} I EC_{50}

Procent przeżycia jaj i larw jest obliczany i korygowany w odniesieniu do śmiertelności w doświadczeniach kontrolnych zgodnie z wzorem Abbotta (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

gdzie,:

P = skorygowany % przeżycia,

P' = % przeżycia obserwowanego w stężeniu do badań,

C = przeżycie w doświadczeniu kontrolnym.

Jeśli to możliwe, LC_{50} jest oznaczana odpowiednią metodą na końcu badania.

Jeśli włączenie morfologicznych anormalności w EC_{50} jest pożądane, wskazówki można znaleźć w Stephan (5).

OSZACOWANIE LOEC NOEC

Celem badania na jajach i narybku jest porównanie niezerowego stężenia z doświadczeniem kontrolnym, tj. określenie LOEC. Dlatego wielokrotne procedury porównawcze muszą być zastosowane (6)(7)(8)(9)(10).

BIBLIOGRAFIA

(1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 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, 311 pp.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabarbling (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173–181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 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, pp. 69–81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096–1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 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, pp. 103–117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 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

DODATEK 2

WARUNKI BADANIA, CZAS TRWANIA I KRYTERIA PRZEŻYCIA W ODNIESIENIU DO ZALECANYCH GATUNKÓW

Gatunek	Temperatura (°C)	Stopień zasolenia (0/00)	Czas naświetlania (h)	Czas trwania stadium (dni)		Typowy czas trwania badania	Przeżycie w doświadczeniu kontronym (minimum %)	
				Embrion	Narybek		Powodzenie wylęgu	Powylęgowe
SŁODKOWODNE								
Brachydanio rerio Danio pręgowany	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	Tak szybko jak to możliwe po zapłodnieniu (wczesne stadium gastruli) do 5 dni po wylęgu (8–10 dni)	80	90
Oncorhynchus mykiss Pstrąg tęczowy	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)		0 (3)	30–35	25–30	Tak szybko jak to możliwe po zapłodnieniu (wczesne stadium gastruli) do 20 dni po wylęgu (50–55 dni)	66	70
Cyprinus carpio Zwykły karp	21–25	—	12–16	5	> 4	Tak szybko jak to możliwe po zapłodnieniu (wczesne stadium gastruli) do 4 dni po wylęgu (8–9 dni)	80	75
Oryzias latipes	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12–16	8–11	4–8	Tak szybko jak to możliwe po zapłodnieniu (wczesne stadium gastruli) do 5 dni po wylęgu (13–16 dni)	80	80
Pimephales promelas	25 ±2	—	16	4–5	5	Tak szybko jak to możliwe po zapłodnieniu (wczesne stadium gastruli) do 4 dni po wylęgu (8–9dni)	60	70

(1) Dla embrionów.
(2) Dla larw.
(3) Ciemność dla embrionów i larw do jednego tygodnia po wylęgu, z wyjątkiem, gdy są ich sprawdzane. Następnie przytłumione oświetlenie przez badanie.

▼B

DODATEK 3

Warunki badania, czas trwania i kryteria przeżycia w odniesieniu do innych dobrze udokumentowanych gatunków

Gatunki	Temperatura (°C)	Stopień zasolenia (0/00)	Czas naświetlania (godz.)	Czas trwania stadium (dni)		Typowy czas trwania badania embrionów i narybka	Przeżycie w doświadczeniu kontrolnym (minimum %)	
				Embrion	Badanie narybka		Powodzenie wylęgu	Powylęgowe
SŁODKOWODNE								
Carassius auratus Karaś srebrzysty	24 ± 1	—	—	3–4	> 4	Tak szybko jak to możliwe po zapłodnieniu (wczesne stadium gastruli) do 4 dni po wylęgu (7 dni)	—	80
Leopomis macrochirus Bassek błękitny	21 ± 1	—	16	3	> 4	Tak szybko jak to możliwe po zapłodnieniu (wczesne stadium gastruli) do 4 dni po wylęgu (7 dni)	—	75
SŁONOWODNE								
Menidia peninsulae	22–25	15–22	12	1,5	10	Tak szybko jak to możliwe po zapłodnieniu (wczesne stadium gastruli) do 5 dni po wylęgu (6–7 dni)	80	60
Clupea harengus Śledź pospolity	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	Tak szybko jak to możliwe po zapłodnieniu (wczesne stadium gastruli) do 3 dni po wylęgu (23–27dni)	60	80
Gadus morhua Dorsz	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	Tak szybko jak to możliwe po zapłodnieniu (wczesne stadium gastruli) do 3 dni po wylęgu (18 dni)	60	80
Cyprinodon variegatus	25 ± 1	15–30	12	—	—	Tak szybko jak to możliwe po zapłodnieniu (wczesne stadium gastruli) do 4/7dni po wylęgu (28 dni)	> 75	80

▼B

DODATEK 4

NIEKTÓRE CECHY CHEMICZNE DOPUSZCZONEJ WODY ROZCIEŃCZAJĄCEJ

Substancja	Stężenie
Cząstki stale	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 mg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 µg/l
Szczątkowy chlor	< 10 µg/l
Całkowite pestycydy fosforoorganiczne	< 50 µg/l
Całkowite pestycydy chloroorganiczne plus polichlorowane bifenyle	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l

▼B

C.16. PSZCZOŁY MIODNE – BADANIE TOKSYCZNOŚCI OSTREJ DROGĄ POKARMOWĄ

1. METODA

Niniejsza metoda badania toksyczności ostrej jest kopią OECD TG 213 (1998).

1.1. WPROWADZENIE

Niniejszy badanie toksyczności jest laboratoryjną metodą, zaprojektowaną do oceny ostrej toksyczności środków ochrony roślin i innych substancji chemicznych do dorosłych robotnic pszczół miodnych.

Przy oszacowaniu i ocenie cech toksyczności substancji chemicznej oznaczenie ostrej toksyczności drogą pokarmową dla pszczół miodnych jest wymagane np. gdy jest prawdopodobna ekspozycja pszczół na działanie danej substancji chemicznej. Badanie toksyczności ostrej drogą pokarmową jest przeprowadzane dla ustalenia właściwej toksyczności dla pszczół, pestycydów i innych substancji chemicznych. Wyniki niniejszego badania powinny być wykorzystane do określenia potrzeby dalszej oceny. W szczególności niniejsza metoda może być zastosowana w programach odcinkowych oceny niebezpieczeństwa pestycydów dla pszczół, w oparciu o kolejne postępy badań toksyczności laboratoryjnych do półpolowych i polowych eksperymentów (1). Pestycydy mogą być badane jako substancje aktywne (a.s.) lub jako wytworzone produkty.

Standard toksyczności powinien być zastosowany do sprawdzenia wrażliwości pszczół i precyzji procedury badania.

1.2. DEFINICJE

Ostra toksyczność drogą pokarmową: jest negatywnymi skutkami powstającymi w granicach maksymalnego okresu 96 godzin po podaniu doustnym pojedynczej dawki badanej substancji.

Dawka: jest ilością substancji badanej spożytej. Dawka jest wyrażana jako masa (μg) substancji badanej na badane zwierzę (μg/pszczoła). Rzeczywista dawka dla każdej pszczoły nie może być obliczona, ponieważ są karmione wspólnie, ale średnia dawka może być oszacowana (całkowita ilość spożytej substancji badanej/ilość badanych pszczół w jednej klatce).

LD_{50} (średnia dawka śmiertelna) drogą pokarmową: jest statystycznie wyprowadzoną pojedynczą dawką substancji, która powoduje zgonu 50 % zwierząt przy podaniu drogą pokarmową. Wartość LD_{50} jest wyrażona w (μg) substancji badanej na pszczołę. W odniesieniu do pestycydów substancją badaną może być substancja aktywna (a.s.) albo wytworzony produkt zawierający jedną lub więcej niż jedną substancję aktywną.

Śmiertelność: zwierzę jest rejestrowane jako martwe, gdy jest zupełnie nieruchome.

1.3. ZASADA METODY BADANIA

Dorosłe robotnice pszczół miodnych (*Apis mellifera*) są eksponowane w zakresie dawek substancji badanej rozproszonej w roztworze sacharozy. Następnie pszczoły są karmione tą samą dietą, wolną od substancji badanej. Śmiertelność jest rejestrowana codziennie podczas co najmniej 48 godzin i porównywana z wartościami kontrolnymi. Jeśli wskaźnik śmiertelności zwiększa się między 24 i 48 godziną, podczas gdy śmiertelność w doświadczeniu kontrolnym pozostaje na akceptowalnym poziomie, tj. < 10 %, właściwe jest rozciągnięcie czasu trwania badania do maksimum 96 godzin. Wyniki są analizowane w celu obliczenia LD_{50} w 24 i 48 godzinie i, w przypadku gdy badanie jest przedłużone, w 72 i 96 godzinie.

▼B

1.4. WAŻNOŚĆ BADANIA

Aby badanie było ważne, mają zastosowanie następujące warunki:

— średnia śmiertelność dla wszystkich doświadczeń kontrolnych nie może przekraczać 10 % na końcu badania,

— LD_{50} normy toksyczności spełnia określony zakres.

1.5. OPIS METODY BADANIA

1.5.1. **Zbieranie pszczół**

Młode dojrzałe robotnice pszczół z tej samej rasy muszą być użyte, tj. pszczoły w tym samym wieku, statusie żywieniowym itd. Pszczoły powinny być uzyskane z kolonii, właściwie odżywianej, zdrowej, tak dalece jak to możliwe wolnej od chorób, o właściwej królowej, o znanej historii i fizjologicznym statusie. Mogą być zebrane rano przed użyciem lub wieczorem przed badaniem i przechowane w warunkach badania do następnego dnia. Odpowiednie są pszczoły zebrane z ram, bez potomstwa. Należy uniknąć zbierania pszczół wczesną wiosną lub późną jesienią, gdyż podczas tego okresu mają zmienioną fizjologię. Jeżeli badania muszą być prowadzone wczesną wiosną lub późną jesienią, pszczoły umieszcza się w inkubatorze i hoduje przez tydzień na „pszczelim chlebie" (pyłek zebrany z grzebienia) i roztworze sacharozy. Pszczoły traktowane substancjami chemicznymi, takimi jak antybiotyki, produkty przeznaczone do zwalczania warrozy itd., nie powinny być używane do badań toksyczności przez cztery tygodnie od czasu końca ostatniego traktowania.

1.5.2. **Pomieszczenie i warunki żywienia**

Stosuje się łatwe do czyszczenia i dobrze wentylowane klatki. Należy stosować właściwe materiały, na przykład stal nierdzewną, siatkę drucianą, plastikowe lub jednorazowe drewniane klatki. Zalecane są grupy po dziesięć pszczół na klatkę. Wymiary klatek do badań muszą być właściwe do ilości pszczół, tj. zapewniać wystarczającą przestrzeń.

Pszczoły powinny być trzymane w ciemności, w pokoju doświadczalnym w temperaturze 25 ± 2 °C. Wilgotność względna, zwykle około 50–70 %, powinna być rejestrowana w czasie badania. Procedury postępowania, włączając traktowanie i obserwacje, prowadzi się w dziennym świetle. Roztwory sacharozy w wodzie o stężeniu końcowym 500 g/l (50 % wag./obj.) powinny być stosowane jako pokarm. Po podaniu próbnych dawek pokarm powinien być zapewniany *ad libitum*. System podawania pokarmu powinien umożliwiać rejestrowanie poboru pokarmu powinien odniesieniu do każdej klatki (zob. pkt 1.6.3.1). Może to być szklana rura (około 50 mm długości i 10 mm szerokości z otwartym zwężającym się końcem do około 2 mm średnicy).

1.5.3. **Przygotowanie pszczół**

Zebrane pszczoły mogą być przypadkowo rozmieszczane w klatkach do badań rozmieszczonych losowo w pokoju doświadczalnym.

▼B

Pszczoły mogą być zagłodzone przez 2 h przed rozpoczęciem badania. Zalecane jest, aby pszczoły pozbawiono pokarmu przed traktowaniem, tak aby wszystkie pszczoły miały równe warunki odnośnie do zawartości jelit na początku badania. Konające pszczoły powinny być usunięte i zastąpione zdrowymi przed rozpoczęciem badania.

1.5.4. **Przygotowanie dawek**

W przypadku gdy substancja badana jest związkiem mieszającym się z wodą, roztwarza się ją bezpośrednio w 50 % roztworze sacharozy. W odniesieniu do produktów technicznych i substancji o niskiej rozpuszczalności w wodzie stosuje się nośniki takie, jak organiczne rozpuszczalniki, emulgatory lub dyspergatory o niskiej toksyczności dla pszczół (np. aceton, dimetyloformamid, dimetylosulotlenek). Stężenie nośnika zależy od rozpuszczalności badanej substancji i powinno być takie same dla wszystkich badanych stężeń. Jednakże 1 % stężenie nośnika jest ogólnie właściwe i nie może być przekraczane.

Powinny być przygotowane roztwory kontrolne, tj. w przypadku gdy stosuje się rozpuszczalnik lub dyspergator do rozpuszczenia substancji badanej, należy użyć dwóch oddzielnych roztworów kontrolnych: roztwór w wodzie i roztwór sacharozy z układem rozpuszczalnik/dyspergator o stężeniu stosowanym w roztworach dozujących.

1.6. PROCEDURA

1.6.1. **Grupy badane i kontrolne**

Liczba dawek i testowanych kopii musi spełniać wymagania statystyczne dla oznaczenia LD_{50} z 95 % granicą ufności. Zwykle pięć dawek w serii geometrycznej, ze wskaźnikiem nieprzekraczającym 2,2 i obejmującym zakres dla LD_{50}, jest wymaganych dla badania. Jednakże wskaźnik rozcieńczenia i liczba stężeń w odniesieniu do dozowania muszą być ustalone w zależności od zbocza krzywej toksyczności (dawka w zależności od śmiertelności) i uwzględnione w ramach wybranej metody statystycznej do analizy wyników. Badanie znalezienia zakresu umożliwia wybór właściwych stężeń do dozowania.

Należy użyć minimum trzech kopii grup badanych, po 10 pszczół każda, dozowanych każdym stężeniem badanym. Minimum trzy kontrolne partie, każda po 10 pszczół, powinny być dodatkowo włączone w przebieg serii badań. Partie kontrolne powinny być także włączone, gdy stosowany jest układ rozpuszczalnik/nośnik (zob. pkt 1.5.4).

1.6.2. **Norma toksyczności**

W badane serie należy włączyć normę toksyczności. Co najmniej trzy dawki muszą być wybrane do pokrycia wartości oczekiwanej LD_{50}. Co najmniej trzy skopiowane klatki, każda zawierająca 10 pszczół, należy użyć dla każdej badanej dawki. Zalecaną normą toksyczności jest dimetoat, dla którego doniesienie o LD_{50}-24 h, drogą pokarmową jest w zakresie 0,10–0,35 µg a.s./pszczoła (2). Jednakże inne normy toksyczności byłyby również dopuszczalne w przypadku, gdy można dostarczyć wystarczających danych do sprawdzenia oczekiwanej reakcji na dawkę (np. paration).

▼B

1.6.3. **Ekspozycja**

1.6.3.1. *Podawanie dawek*

Każdej badanej grupie pszczół należy dostarczyć 100–200 µl 50 % roztworu sacharozy w wodzie, zawierającego badaną substancję o właściwym stężeniu. Większa objętość jest wymagana w odniesieniu do produktów o niskiej rozpuszczalności, niskiej toksyczności lub stężeniu w składzie, ponieważ muszą być zastosowane wyższe proporcje w roztworze sacharozy. Ilość traktowanej, spożytej diety przez grupę musi być monitorowana. Zużyty podajnik (zwykle 3–4 godz.) powinien być usunięty z klatki i zastąpiony podajnikiem wypełnionym tylko roztworem sacharozy. Roztwory sacharozy są wtedy dostarczane *ad libitum*. W odniesieniu do niektórych związków odrzucenie wyższego stężenia dawki badanej objawia się w małej konsumpcji pokarmu lub jej braku. Po maksimum 6 godz. niespożyta traktowana dieta powinna być zastąpiona samym roztworem sacharozy. Ilość spożytej traktowanej diety musi być oszacowana (np. pomiar objętość/waga pozostałej traktowanej diety).

1.6.3.2. *Czas trwania*

Zalecany czas trwania badania wynosi 48 godz. po zastąpieniu roztworu badanego, roztworem samej sacharozy. Jeśli śmiertelność nadal wzrasta do więcej niż 10 % po pierwszych 24 godz., czas trwania badania powinien być przedłużony do maksimum 96 godz., zapewniając, że śmiertelność w doświadczeniu kontrolnym nie przewyższa 10 %.

1.6.4. **Obserwacje**

Śmiertelność jest rejestrowana w 4 godziny po rozpoczęciu badania, a w okresie późniejszym w 24 i 48 godzinie (tj. po podaniu dawki). Jeśli wymagany jest przedłużony okres obserwacji, następne oceny powinny być dokonane w 24 godzin przedziałach czasowych, do maksimum 96 godzin, pod warunkiem że śmiertelność w doświadczeniu kontrolnym nie przekroczy 10 %.

Ilości pokarmu spożytego na grupę powinna być oszacowana. Porównanie wskaźników spożycia traktowanej i nietraktowanej diety w danych 6 godzinach dostarcza informacji o strawności diety traktowanej.

Wszystkie anormalne efekty zachowania zaobserwowane w trakcie okresu badania powinny być zarejestrowane.

1.6.5. **Badanie graniczne**

W pewnych przypadkach (np. gdy oczekuje się, że substancja badana posiada niską toksyczność) należy przeprowadzić badanie graniczne, stosując 100 µg a.s./pszczołę w celu ukazania, że LD_{50} jest większa niż niniejsza wartość. Ta sama procedura powinna być zastosowana do, włączając trzy skopiowane grupy badane dla dawki badanej, odpowiednich doświadczeń kontrolnych, oceny ilości traktowanej diety spożytej oraz użycia normy toksyczności. Jeśli występuje śmiertelność, powinny być przeprowadzone pełne badania. Jeśli obserwuje się podśmiertelne skutki (zob. pkt 1.6.4), powinny być one zarejestrowane.

▼B

2. **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

2.1. DANE

Dane powinny być zestawione w formie tabelarycznej, pokazując w odniesieniu do każdej traktowanej grupy, jak również w odniesieniu do grup kontrolnych i grup norm toksyczności, ilość użytych pszczół, śmiertelność w dowolnym momencie obserwacji i liczbę pszczół o negatywnym zachowaniu. Analiza danych śmiertelności właściwymi metodami statystycznymi (np. analiza probitowa, średnia krocząca, prawdopodobieństwo dwumianu) (3)(4). Wykreślone krzywe dawka-reakcja w każdym zalecanym momencie obserwacji i obliczenia zboczy krzywych oraz średnie dawki śmiertelne (LD_{50}) z 95 % granicami ufności. Poprawki dotyczące śmiertelności w doświadczeniach kontrolnych mogą być dokonane przy użyciu poprawki Abbotta (4)(5). W przypadku gdy traktowana dieta nie jest całkowicie spożyta, powinna być ustalona dawka substancji badanej spożytej przez grupę. LD_{50} powinna być wyrażona w μg substancji badanej na pszczołę.

2.2. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

2.2.1. **Substancja użyta w badaniu:**

— charakter fizyczny i stosowne właściwości fizyko-chemiczne (np. stabilność w wodzie, ciśnienie pary),

— dane dotyczące identyfikacji chemicznej włączając wzór strukturalny, czystość (tj. w odniesieniu do pestycydów identyfikację i stężenie aktywnej(-ych) substancji).

2.2.2. **Gatunki użyte w badaniu:**

— nazwa naukowa, rasa, przybliżony wiek (w tygodniach), metoda zbierania, dane dotyczące zbierania,

— informacje dotyczące kolonii używanych do zbierania pszczół badanych, włączając stan zdrowotny, choroby wieku dorosłego, wszystkie wcześniejsze traktowania itd.

2.2.3. **Warunki badania:**

— temperatura i wilgotność względna pokoju doświadczalnego,

— warunki pomieszczenia włączając typ, wymiary i materiał klatki,

— metody przygotowania roztworu wyjściowego i roztworów badanych (rozpuszczalnik i jego stężenia muszą być podane, gdy zostały zastosowane),

— metoda przygotowania roztworu wyjściowego i częstotliwość odnawiania (środek ułatwiający rozpuszczanie i jego stężenia muszą być podane, gdy zostały zastosowane),

— projekt badania, np. liczba i stężenia badane użyte, ilość doświadczeń kontrolnych w odniesieniu do każdego stężenia badanego i doświadczenia kontrolnego, liczba kopii klatek i liczba pszczół na klatkę,

— data badania.

▼B

2.2.4. **Wyniki:**

— wyniki badań wstępnego szukania zakresu, jeśli wykonano,

— pierwotne dane: śmiertelność przy każdej dawce badanej w dowolnym momencie obserwacji,

— wykresy krzywych dawka-reakcja na koniec badania,

— wartość LD_{50} z granicami ufności 95 % w zalecanym momencie obserwacji, w odniesieniu do substancji badanej i normy toksyczności,

— zastosowane procedury statystyczne do określenia LD_{50},

— śmiertelność w doświadczeniach kontrolnych,

— inne skutki biologiczne zaobserwowane lub pomierzone, np. anormalne zachowanie pszczół (włączając odrzucenie dawki badanej), wskaźnik spożycia diety w traktowanych i nietraktowanych grupach,

— wszelkie odchylenia od opisanych tutaj procedur badania oraz wszelkie inne istotne informacje.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(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, pp. 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, pp. 119–125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 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, pp. 265–267.

▼B

C.17. PSZCZOŁY MIODNE – BADANIE KONTAKTOWEJ TOKSYCZNOŚCI OSTREJ

1. METODA

Niniejsza metoda badania kontaktowej toksyczności ostrej jest kopią OECD TG 214 (1998 r.).

1.1. WPROWADZENIE

Niniejsze badanie toksyczności jest laboratoryjną metodą, zaprojektowaną do oceny kontaktowej ostrej toksyczności środków ochrony roślin i innych substancji chemicznych do dorosłych robotnic pszczół miodnych.

Przy oszacowaniu i ocenie cech toksyczności substancji chemicznej oznaczenie ostrej toksyczności kontaktowej dla pszczół miodnych jest wymagane np. gdy jest prawdopodobna ekspozycja pszczół na działanie danej substancji chemicznej. Badanie kontaktowej toksyczności ostrej jest przeprowadzane dla ustalenia właściwej toksyczności w odniesieniu do pszczół, pestycydów i innych substancji chemicznych. Wyniki niniejszego badania powinny być wykorzystane do określenia potrzeby dalszej oceny. W szczególności niniejsza metoda może być stosowana w programach odcinkowych oceny niebezpieczeństwa pestycydów dla pszczół, w oparciu o kolejne postępy badań toksyczności laboratoryjnych do półpolowych i polowych eksperymentów (1). Pestycydy mogą być badane jako substancje aktywne (a.s.) lub jako wytworzone produkty.

Norma toksyczności powinna być zastosowana do sprawdzenia wrażliwości pszczół i precyzji procedury badania.

1.2. DEFINICJE

Ostra toksyczność drogi pokarmowej: są to negatywne skutki powstające w granicach maksymalnego okresu 96 godzin po miejscowym podaniu pojedynczej dawki substancji.

Dawka: jest ilością substancji badanej zastosowanej. Dawka jest wyrażana jako masa (μg) substancji badanej na badane zwierzę (μg/pszczołę).

LD_{50} (średnia dawka śmiertelna) kontaktowa: jest statystycznie wyprowadzoną pojedyńczą dawką substancji, która powoduje zgon u 50 % zwierząt poprzez kontakt. Wartość LD_{50} jest wyrażona w μg substancji badanej na pszczołę. W odniesieniu do pestycydów substancją badaną może być substancja aktywna (a.s.) albo wytworzony produkt zawierający jedną lub więcej niż jedną substancję aktywną.

Śmiertelność: zwierzę jest rejestrowane jako martwe, gdy jest zupełnie nieruchome.

1.3. ZASADA METODY BADANIA

Dorosłe robotnice pszczół miodnych (*Apis mellifera*) są eksponowane w zakresie dawek substancji badanej rozproszonej we właściwym nośniku, przez bezpośrednie nałożenie na tułów (kropelki). Czas trwania badania wynosi 48 godz. Jeśli wskaźnik śmiertelności zwiększa się między 24 a 48 godz., podczas gdy śmiertelność w doświadczeniach kontrolnych pozostaje na akceptowalnym poziomie, tj. < 10 %, właściwe jest przedłużenie czasu trwania badania do maksimum 96 godz. Śmiertelność jest rejestrowana codziennie i porównywana z wartościami kontrolnymi. Wyniki są analizowane w celu obliczenia LD_{50} w 24 i 48 godz. oraz, w przypadku gdy badanie jest przedłużone, w 72 i 96 godz.

▼B

1.4. WAŻNOŚĆ BADANIA

Aby badanie było ważne, mają zastosowanie następujące warunki:

— średnia śmiertelność w odniesieniu do wszystkich doświadczeń kontrolnych nie może przekraczać 10 % na końcu badania,

— LD_{50} normy toksyczności odpowiada określonemu zakresowi.

1.5. OPIS METODY BADANIA

1.5.1. **Zbieranie pszczół**

Młode dojrzałe robotnice pszczół z tej samej rasy powinny być użyte, tj. pszczoły w tym samym wieku, statusie żywieniowym itd. Pszczoły powinny być uzyskane z kolonii, właściwie odżywianej, zdrowej, tak dalece jak to możliwe wolnej od chorób, o właściwej królowej, o znanej historii i fizjologicznym statusie. Muszą być zebrane rano przed użyciem lub wieczorem przed badaniem i przechowane w warunkach badania do następnego dnia. Odpowiednie są pszczoły zebrane z ram, bez potomstwa. Należy uniknąć zbierania pszczół wczesną wiosną lub późną jesienią, gdyż podczas tego okresu mają zmienioną fizjologię. Jeżeli badania muszą być prowadzone wczesną wiosną lub późną jesienią, pszczoły umieszcza się w inkubatorze i hoduje przez tydzień na „pszczelim chlebie" (pyłek zebrany z grzebienia) i roztworze sacharozy. Pszczoły traktowane substancjami chemicznymi, takimi jak antybiotyki, produkty przeznaczone do zwalczania warrozy itd., nie mogą być używane do badań toksyczności przez cztery tygodnie od chwili zakończenia ostatniego traktowania.

1.5.2. **Pomieszczenie i warunki żywienia**

Stosuje się łatwe do czyszczenia i dobrze wentylowane klatki. Należy stosować właściwe materiały, na przykład stal nierdzewną, siatkę drucianą, plastikowe lub jednorazowe drewniane klatki. Zalecane są grupy po dziesięć pszczół na klatkę. Wymiary klatek do badań muszą być odpowiednie do ilości pszczół, tj. zapewniać wystarczającą przestrzeń.

Pszczoły powinny być trzymane w ciemności, w pokoju doświadczalnym w temperaturze 25 ± 2 °C. Wilgotność względna, zwykle około 50–70 %, powinna być rejestrowana w czasie badania. Procedury postępowania włączając traktowanie i obserwacje prowadzi się w dziennym świetle. Roztwory sacharozy w wodzie o stężeniu końcowym 500 g/l (50 % wag./obj.) stosowane są jako pokarm podawany *ad libitum* w czasie trwania badania, używając podajnik pszczół. Może to być szklana rura (około 50 mm długości i 10 mm szerokości z otwartym zwężającym się końcem do około 2 mm średnicy).

1.5.3. **Przygotowanie pszczół**

Zebrane pszczoły są znieczulane dwutlenkiem węgla lub azotem w celu zastosowania substancji badanej. Ilość środka znieczulającego i czas ekspozycji powinien być zminimalizowany. Konające pszczoły powinny być usunięte i zastąpione zdrowymi pszczołami przed rozpoczęciem badania.

1.5.4. **Przygotowanie dawek**

Substancja badana ma być zastosowana jako roztwór w nośniku, tj. organicznym rozpuszczalniku lub wodnego roztworu ze środkiem zwilżającym. Z organicznych rozpuszczalników zalecany jest aceton, lecz mogą być użyte inne organiczne rozpuszczalniki o niskiej toksyczności dla pszczół (np. dwumetyloformamid, dwumetylosulfotlenek). Dla rozproszonych w wodzie określonych produktów i wysokopolarnych substancji organicznych nierozpuszczalnych w rozpuszczalnikowych organicznych nośnikach, roztwory łatwiej podawać, gdy przygotuje się słaby roztwór handlowego środka zwilżającego (np. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Powinny być przygotowane właściwe roztwory kontrolne, tj. w przypadku gdy użyto rozpuszczalnika albo dyspergator dla rozpuszczenia substancji badanej, powinny być zastosowane dwie kontrolne grupy, jedna traktowana wodą i jedna traktowana układem rozpuszczalnik/dyspergator.

1.6. PROCEDURA

1.6.1. **Grupy badane i kontrolne**

Liczba dawek i badanych kopii powinna odpowiadać wymaganiom statystycznym dotyczącym określenia LD_{50} z granicami ufności 95 %. Zwykle pięć dawek w serii geometrycznej, ze wskaźnikiem nieprzekraczającym 2,2 i obejmującym zakres dla LD_{50}, jest wymaganych w odniesieniu do badań. Jednakże liczba dawek musi być ustalona w zależności od zbocza krzywej toksyczności (dawka w zależności od śmiertelności) i z uwzględnieniem wybranej metody statystycznej do analizy wyników. Badanie szukania zakresu umożliwia wybór właściwych stężeń do dozowania.

Należy użyć minimum trzech kopii grup badanych, po 10 pszczół każda, dozowanych każdym stężeniem badanym.

Minimum trzy kontrolne partie, każda po 10 pszczół, powinny być dodatkowo włączone w przebieg serii badań. Jeśli rozpuszczalnik organiczny lub środek zwilżający jest stosowany, trzy partie kontrolne, każda po 10 pszczół dla rozpuszczalnika i środka zwilżającego, muszą być włączone.

1.6.2. **Norma toksyczności**

W badane serie należy włączyć normę toksyczności. Co najmniej trzy dawki powinny być wybrane do pokrycia oczekiwanej wartości LD_{50}. Co najmniej trzy skopiowane klatki, każda zawierająca 10 pszczół, należy użyć przy każdej badanej dawce. Zalecaną normą toksyczności jest dimetoat, dla którego oświadczone ustnie LD_{50}-24 h, drogą pokarmową jest w zakresie 0,10–0,35 μg a.s./pszczołę (2). Jednakże inne normy toksyczności byłyby również dopuszczalne w przypadku, gdy można dostarczyć wystarczających danych do sprawdzenia oczekiwanej reakcji na dawkę (np. paration).

1.6.3. **Ekspozycja**

1.6.3.1. *Podawanie dawek*

Znieczulone pszczoły są pojedynczo poddawane zabiegowi miejscowemu podaniu dawki. Pszczoły są losowo poddawane różnym próbnym i kontrolnym dawkom. Objętość 1 μl roztworu zawierającego substancję badaną o odpowiednim stężeniu powinna być podana mikroaplikatorem do grzbietowej strony tułowia każdej pszczoły. Można użyć inne objętości, jeśli jest to uzasadnione. Po podaniu dawki pszczoły są umieszczane w klatkach do badań i żywione roztworami sacharozy.

1.6.3.2. *Czas trwania*

Zalecany czas trwania badania wynosi 48 godz. Jeśli śmiertelność wzrasta o więcej niż 10 % między 24 a 48 godz., czas trwania badania powinien być przedłużony do maksimum 96 godz., pod warunkiem że śmiertelność przy doświadczeniu kontrolnym nie przewyższa 10 %.

▼B

1.6.4. **Obserwacje**

Śmiertelność jest rejestrowana w 4 godzinie po dozowaniu, a w okresie późniejszym w 24 i 48 godzinie. Jeśli wymagany jest przedłużony okres obserwacji, dalsze oceny powinny być dokonywane w 24-godzinnych przedziałach czasowych, do maksimum 96 godzin, pod warunkiem że śmiertelność przy doświadczeniu kontrolnym nie przekracza 10 %.

Wszystkie anormalne skutki zachowywania się w czasie trwania badania powinny być zarejestrowane.

1.6.5. **Badanie graniczne**

W niektórych przypadkach (np. gdy oczekuje się, że substancja badana posiada niską toksyczność) można przeprowadzić badanie graniczne, stosując 100 µg a.s./pszczoła w celu ukazania, że LD_{50} jest większa niż niniejsza wartość. Ta sama procedura powinna być zastosowana, włączając trzy skopiowane grupy badane, w odniesieniu do dawki badanej, odpowiednich dawek kontrolnych oraz użycia normy toksyczności. Jeśli występuje śmiertelność, powinny być przeprowadzone pełne badania. Jeśli obserwuje się podśmiertelne skutki (zob. pkt 1.6.4), powinny one być zarejestrowane.

2. **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

2.1. DANE

Dane powinny być zestawione w formie tabelarycznej, pokazując w odniesieniu do każdej traktowanej grupy, jak również w odniesieniu do grup kontrolnych i grup normy toksyczności, ilość użytych pszczół, śmiertelność w każdym momencie obserwacji i liczbę pszczół o negatywnym zachowaniu. Analiza danych dotyczących śmiertelności właściwymi metodami statystycznymi (np. analiza probitowa, średnia krocząca, prawdopodobieństwo dwumianu) (3)(4). Wykreślone krzywe dawka-reakcja w każdym zalecanym momencie obserwacji (tj. 24, 48 godz. i, jeśli to stosowne, 72 i 96 godz.) i obliczenia zboczy krzywych oraz średnie dawki śmiertelne (LD_{50}) z granicami ufności 95 %. Poprawki w odniesieniu do śmiertelności przy doświadczeniu kontrolnym powinny być wykonane przy użyciu poprawki Abbotta (4)(5). LD_{50} powinna być wyrażona w µg substancji badanej na pszczołę.

2.2. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

2.2.1. **Substancja użyta w badaniu:**

— charakter fizyczny i stosowne właściwości fizyko-chemiczne (np. stabilność w wodzie, ciśnienie pary),

— dane identyfikacji chemicznej, włączając wzór strukturalny, czystość (tj. w odniesieniu do pestycydów identyfikację i stężenie aktywnej substancji).

2.2.2. **Gatunki użyte w badaniu:**

— nazwa naukowa, rasa, przybliżony wiek (w tygodniach), metoda zbierania, dane dotyczące zbierania,

— informacje dotyczące kolonii używanych do zbierania pszczół badanych, włączając stan zdrowotny, choroby wieku dorosłego, wszystkie wcześniejsze traktowania itd.

▼B

2.2.3. **Warunki badania:**

— temperatura i wilgotność względna pokoju doświadczalnego,

— warunki pomieszczenia, włączając typ, wymiary i materiał klatki,

— metody podawania substancji badanej, np. użyty nośnik, rozpuszczalnik, objętość zastosowanego roztworu badanego, użyte znieczulenie,

— projekt badania, np. ilość i użyte dawki badane, liczba doświadczeń kontrolnych dla próbnej dawki i pomiaru, liczba kopii klatek i liczba pszczół na klatkę,

— data badania.

2.2.4. **Wyniki:**

— wyniki badań wstępnego szukania zakresu, jeśli wykonano,

— pierwotne dane: śmiertelność przy każdym stężeniu badanym w każdej chwili obserwacji,

— wykresy krzywych dawka-reakcja na koniec badania,

— wartość LD_{50} z 95 % limitem zaufania w każdym zalecanym momencie obserwacji, w odniesieniu do substancji badanej i normy toksyczności,

— zastosowane procedury statystyczne do określenia LD_{50},

— śmiertelność w doświadczeniach kontrolnych,

— inne skutki biologiczne zaobserwowane lub pomierzone i wszystkie anormalne reakcje pszczół,

— wszelkie odchylenia od opisanej tutaj metody badania i wszystkie inne istotne informacje.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(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, pp. 151–165. March 1993.

(2) Gough, H. J., Mclndoe, 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, pp. 119–125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 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, pp. 265–267.

▼B

C.18. **ADSORPCJA/DESORPCJA PRZY UŻYCIU METODY RÓWNOWAGI OKRESOWEJ**

1. **METODA**

Niniejsza metoda jest kopią OECD TG 106, w odniesieniu do określenia adsorpcji/desorpcji gleby przy użyciu metody równowagi okresowej (2000 r.).

1.1. WPROWADZENIE

Metoda uwzględnia próbę obrączkową i warsztat dotyczący wyboru gleby dla rozwoju badania adsorpcji (1)(2)(3)(4), a także istniejące wytyczne na poziomie krajowym (5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

Badania adsorpcji/desorpcji są użyteczne dla uzyskania podstawowych informacji dotyczących mobilności substancji chemicznych i ich rozłożeniu w ziemnych, wodnych i powietrznych częściach biosfery (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21). Informacje mogą być wykorzystywane w przewidywaniu lub szacowaniu na przykład zdolności substancji chemicznych do degradacji (22)(23), przekształcania i poboru przez organizmy (24); wymywania przez profil gleby (16)(18)(19)(21)(25)(26)(27)(28); lotności z gleby (21)(29)(30); ucieczki z powierzchni ziemi do wód naturalnych (18)(31)(32). Dane dotyczące adsorpcji są wykorzystywane do celów porównawczych i modelowania (19)(33)(34)(35).

Rozłożenie substancji chemicznej między glebę a fazę wodną jest złożonym procesem zależnym od wielu różnych czynników: charakteru chemicznego substancji (12)(36)(37)(38)(39)(40), cech gleby (4)(12)(13)(14)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48)(49), czynników klimatycznych takich, jak opady deszczu, temperatury, światła słonecznego i wiatru. W ten sposób liczne zjawiska i mechanizmy włączają się w proces adsorpcji substancji chemicznej przez glebę i nie mogą być określone całościowo przez uproszczony model laboratoryjny, jak w niniejszej metodzie. Jednakże jeśli nawet ta próba nie może objąć środowiskowo możliwych przypadków, to dostarcza cennych informacji odnoszących się do adsorpcji substancji chemicznych w środowisku.

Zob. także Ogólne wprowadzenie.

1.2. ZAKRES

Metoda ma na celu oszacowanie zachowywania adsorpcji/desorpcji substancji w glebie. Celem jest uzyskanie wartości sorpcji, która jest użyteczna do przewidywania podziału w różnorodności warunków środowiskowych; do tego celu współczynniki adsorpcji równowagowej są ustalane w odniesieniu do substancji chemicznych w różnych glebach, jako funkcja cech gleby (np. zawartość węgla organicznego, zawartość gliny i tekstura gleby oraz pH). Należy użyć różnych typów gleby w celu objęcia jak najszerzej zdarzenia współdziałań danej substancji z glebami naturalnymi.

W niniejszej metodzie adsorpcja przedstawia proces wiązania się substancji chemicznej do powierzchni gleby; nie odróżnia między różnymi procesami adsorpcji (fizyczna i chemiczna adsorpcja) i takimi procesami, jak rozkład katalizowany powierzchniowo, masową adsorpcją i chemiczną reakcją. Adsorpcji zdarzającej się na cząstkach koloidów (średnica < 0,2 μm) wytwarzanych przez gleby nie uwzględniono.

▼B

Parametrami gleby, przypuszczalnie najistotniejszymi, w odniesieniu do gleby są: zawartość węgla organicznego (3)(4)(12)(13)(14)(41)(43)(44)(45)(46)(47)(48); zawartość gliny i tekstura gleby (3)(4)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48) i pH w odniesieniu do zjonizowanych związków (3)(4)(42). Inne parametry gleby, które mają wpływ na absorpcję/desorpcję określonej substancji, to efektywna zdolność wymiany kationu (ECEC), zawartość amorficznego żelaza i tlenków glinu, szczególnie w odniesieniu do gleb wulkanicznych i tropikalnych (4), jak również powierzchnia właściwa (49).

Badanie jest zaprojektowane do oceny adsorpcji substancji chemicznej na różnego typu glebach o zróżnicowanym zakresie zawartości węgla organicznego, zawartości gliny i tekstury gleby oraz pH. Obejmuje to trzy warstwy:

Warstwa 1: Badania wstępne w celu ustalenia:

— proporcji gleba/roztwór,

— czasu równowagi dla adsorpcji i ilości substancji badanej zaadsorbowanej w równowadze,

— adsorpcji substancji badanej na powierzchni zbiornika badanego i stabilność badanej substancji w czasie trwania okresu badania.

Warstwa 2: Badanie klasyfikacji: adsorpcja jest badana na pięciu różnych typach gleby za pomocą kinetyki adsorpcji w pojedynczym stężeniu oraz określenie współczynnika podziału K_d i Ko_c.

Warstwa 3: Określenie izoterm adsorpcji Freundlicha dla ustalenia wpływu stężenia na zasięg adsorpcji na glebach.

Badania desorpcji za pomocą kinetyki desorpcji/Freundlicha desorpcji izotermy (dodatek 1).

1.3. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Symbol	Definicja	Jednostki
A_{t_i}	procent adsorpcji w czasie t_i	%
A_{eq}	procent adsorpcji w równowadze adsorpcji	%
$m_s^{ads}(t_i)$	masa substancji badanej zaadsorbowanej na glebie w czasie t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	masa substancji badanej zaadsorbowanej na glebie podczas trwania przedziału czasowego Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	masa substancji badanej zaadsorbowanej na glebie w równowadze adsorpcji	µg
m_0	masa substancji badanej w probówce na początku badania adsorpcji	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	masa substancji badanej, zmierzona w podwielokrotności (v_a^A) w punkcie czasu ti	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	masa substancji w roztworze przy równowadze adsorpcji	µg
m_{soil}	wielkość fazy gleby, wyrażona jako sucha masa gleby	g

▼B

Symbol	Definicja	Jednostki
C_{st}	stężenie masowe roztworu podstawowego substancji	µg cm^{-3}
C_0	początkowe stężenie masowe roztworu badanego w kontakcie z glebą	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	stężenie masowe substancji w fazie wodnej w czasie t_i, w którym dokonywana jest analiza	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	zawartość substancji zaadsorbowanej na glebie przy równowadze adsorpcji	µg cm^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	stężenie masowe substancji w fazie wodnej przy równowadze adsorpcji	µg cm^{-3}
V_0	początkowa objętość fazy wodnej w kontakcie z glebą, w czasie trwania badania adsorpcji	cm^3
v_a^A	objętość podwielokrotności, w której substancja badana została zmierzona	cm^3
K_d	współczynnik podziału dla adsorpcji	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	znormalizowany współczynnik adsorpcji węgla	cm^3 g^{-1}
K_{om}	znormalizowany współczynnik ciał organicznych	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	współczynnik adsorpcji Freundlicha	µg$^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
1/n	wykładnik Freundlicha	
D_{t_i}	procent desorpcji w punkcie czasu ti	%
$D_{\Delta t_i}$	procent desorpcji odpowiadający przedziałowi czasu Δ_{ti}	%
K_{des}	pozorny wspolczynnik desorpcji	µg^{cm-1}
K_F^{des}	wspolczynnik desorpcji Freundlicha	µg^{1-1n} (cm^3)$^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	masa badanej substancji zdesorbowana z gleby w czasie t_j	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	masa badanej substancji zdesorbowana z gleby w czasie Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	masa substancji ustalona analitycznie w wodnej fazie przy równowadze desorpcyjnej	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	całkowita masa badanej substancji zdesorbowanej przy równowadze desorpcyjnej	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	masa substancji pozostająca zaadsorbowana na glebie po przedziale czasowym Δt_i	µg
m_{aq}^A	masa substancji pozostała z równowagi adsorpcji z powodu niecałkowitego podstawienia objętości	µg
$C_s^{des}(eq)$	zawartość badanej substancji pozostająca zaadsorbowana na glebie przy równowadze desorpcyjnej	µg g^{-1}

▼B

Symbol	Definicja	Jednostki
$C_{aq}^{des}(eq)$	stężenie masowe badanej substancji w fazie wodnej przy równowadze desorpcyjnej	μg cm^{-3}
V_T	całkowita objętość fazy wodnej w kontakcie z glebą w czasie trwania doświadczenia kinetyki desorpcji wykonanego metodą seryjną	cm^3
V_R	objętość nadsączu usuniętego z probówki po osiągnięciu równowagi adsorpcji, zastąpionego tą samą objętością roztworu 0,01 M $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	Objętość podwielokrotności pobrana do celu analitycznego w czasie (i), w czasie trwania doświadczenia kinetyki adesorpcji wykonanego metodą seryjną	cm^3
$V_{ra}i^D$	objętość roztworu pobrana z probówki (i) dla pomiaru substancji badanej, w doświadczeniu kinetyki adesorpcji (metoda równoległa)	cm^3
V_r^F	objętość roztworu pobrana z probówki dla pomiaru substancji badanej w rownowadze desorpcji	cm^3
MB	bilans masy	%
m_E	całkowita masa substancji badanej ekstrahowanej z gleby i ścianek zbiornika badanego w dwóch kolejnych czynnościach	μg
V_{rec}	objętość nadsączu odzyskana po równowadze adsorpcji	cm^3
P_{ow}	współczynnik podziału oktanol/woda	
pKa	stała dysocjacji	
S_w	rozpuszczalność w wodzie	g l^{-1}

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Znane objętości roztworów badanej substancji, nieetykietowanej czy też etykietowanej izotopami o znanym stężeniu w 0,01 M $CaCl_2$ są dodane do próbek gleby o znanej suchej masie, wcześniej zrównoważone w 0,01 M $CaCl_2$. Mieszanina jest mieszana przez właściwy czas. Zawiesiny gleby rozdziela się następnie przez odwirowanie i, jeśli pożądane, filtrowane, a faza wodna analizowana. Ilość substancji badanej zaadsorbowana na próbce gleby jest obliczona jako różnica między ilością substancji badanej początkowo obecnej w roztworze a ilością pozostałą na koniec doświadczenia (metoda pośrednia).

Jako opcja, ilość badanej substancji zaadsorbowanej jest także bezpośrednio ustalana analizą gleby (metoda bezpośrednia). Niniejsza procedura obejmująca stopniową ekstrakcję gleby właściwym rozpuszczalnikiem, jest zalecana w przypadku, gdy różnica w stężeniu roztworu substancji nie może być dokładnie ustalona. Przykładami takich przypadków są: adsorpcja substancji badanej na ściankach zbiornika, niestabilność substancji badanej w skali czasu doświadczenia, słabej adsorpcji dającej tylko małe zmiany stężenia w roztworze i silna adsorpcja powodująca niskie stężenie, którego nie można dokładnie określić. Jeśli stosuje się substancję etykietowaną izotopowo, ekstrakcji z gleby można zapobiec za pomocą analizy fazy gleby przez spalanie i obliczenie scyntylacji na cieczowym liczniku. Jednakże cieczowy licznik scyntylacyjny jest techniką nieokreśloną, która nie może rozróżnić między macierzystymi a przekształconymi produktami; dlatego musi być używana tylko wtedy jeżeli badana substancja chemiczna jest stabilna w czasie trwania badań.

▼B

1.5. INFORMACJE DOTYCZĄCE SUB STANCJI BADANEJ

Odczynniki chemiczne powinny być czystości analitycznej. Zalecane jest użycie nieetykietowanych substancji badanych o znanym składzie i czystości co najmniej 95 % lub etykietowanych izotopami substancji badanych o znanym składzie oraz radioczystości. W przypadku wskaźników o krótkim czasie półtrwania należy zastosować poprawki na rozkład.

Przed przeprowadzeniem badania adsorpcji-desorpcji powinny być dostępne następujące informacje o badanej substancji:

a) rozpuszczalność w wodzie (A.6);

b) ciśnienie pary (A.4) i/lub stała Henry'ego;

c) rozkład abiotyczny: hydroliza jako funkcja pH (C.7);

d) współczynnik podziału (A.8);

e) szybka biodegradacja (C.4) lub aerobowe i anaerobowe przekształcenia w glebie;

f) pKa niezjonizowanych substancji;

g) bezpośrednia fotoliza w wodzie (tj. UV-Vis widmo absorpcji w wodzie, wydajność kwantowa) i fotodegradacja na glebie.

1.6. MOŻLIWOŚĆ ZASTOSOWANIA BADANIA

Badanie ma zastosowanie do substancji chemicznych, dla których jest dostępna analityczna metoda z dostateczną dokładnością. Ważnym parametrem wpływającym na wiarygodność wyników, w szczególności kiedy stosowana jest metoda pośrednia, jest stabilność substancji badanej w zakresie czasu badania. Dlatego wstępnym warunkiem jest sprawdzenie stabilności we wstępnych badaniach, jeśli obserwuje się przekształcenie w skali czasu badania, zalecane jest, aby prowadzono główne badania poprzez analizę zarówno gleby jak i fazy wodnej.

Trudności w prowadzeniu niniejszego badania powstają w odniesieniu do substancji badanych, o niskiej rozpuszczalności w wodzie ($S_w < 10^{-4}$ g 1^{-1}), jak również w odniesieniu do wysoce naładowanych substancji, spowodowanych przez fakt, że stężenie w fazie wodnej nie może być zmierzone analitycznie z wystarczającą dokładnością. W tych przypadkach należy podjąć dodatkowe czynności. Wytyczne dotyczące sposobu postępowania z takimi problemami podano we właściwych punktach niniejszej metody.

Przy badaniu lotnych substancji należy zachować ostrożność by zapobiec stratom w czasie trwania badania.

1.7. OPIS METODY

1.7.1. **Aparatura i odczynniki chemiczne**

Zwykły sprzęt laboratoryjny, w szczególności następujące urządzenia:

a) probówki lub zbiorniki do prowadzenia doświadczeń. Istotne jest, aby te probówki i zbiorniki:

— pasowały bezpośrednio do aparatury wirówki w celu zminimalizowania manipulacji i przenoszenia błędów,

— były wykonane z obojętnego materiału o minimalnej adsorpcji badanej substancji na jego powierzchni;

▼B

b) urządzenie do mieszania: podwieszany wibrator lub równoważny osprzęt, utrzymujący glebę w postaci zawiesiny;

c) wirówka: zalecana wysokoobrotowa, na przykład siła odwirowania > 3 000 g, kontrolowana odnośnie do temperatury, zdolna do usuwania cząstek o średnicy większej niż 0,2 μm z roztworu wodnego. Pojemniki powinny być zamykane w czasie wirowania i mieszania w celu uniknięcia zmian i strat wody; w celu zminimalizowania adsorpcji na nich należy użyć nieaktywne zamknięcia na przykład pokrywki śrubowe z teflonu;

d) fakultatywnie: urządzenie filtracyjne; filtry o porowatości 0,2 μm, sterylne, jednorazowego użytku. Należy zwrócić szczególną uwagę przy wyborze materiału filtra aby uniknąć jakichkolwiek strat na nim; w odniesieniu do słabo rozpuszczalnych substancji badanych nie zaleca się filtra z materiału organicznego;

e) analityczne oprzyrządowanie, odpowiednie do pomiarów stężenia badanej substancji chemicznej;

f) suszarka laboratoryjna, zdolna utrzymać temperaturę od 103 °C do 110 °C.

1.7.2. **Scharakteryzowanie i wybór gleb**

Gleby powinny być scharakteryzowane przez trzy parametry uważane za w dużej mierze odpowiedzialne za zdolności adsorpcyjne: węgiel organiczny, zawartość gliny i tekstura gleby oraz pH. Jak już wspomniano (zob. zakres) inne fizykochemiczne właściwości gleby wpływają na adsorpcję/desorpcję określonych substancji i powinny być rozważone w takich przypadkach.

Metody używane do scharakteryzowania gleby są bardzo istotne oraz posiadają znaczący wpływ na wyniki. Dlatego jest zalecane, aby pH gleby było mierzone w roztworze 0,01 M $CaCl_2$ (jest to roztwór używany w badaniach adsorpcja/desorpcja) zgodnie z odpowiednią metodą ISO (ISO-10390-1). Jest także zalecane, aby inne stosowne właściwości gleby były ustalane zgodnie ze standardowymi metodami (na przykład „Handbook of Soil Analysis” ISO); pozwala to na oparcie analizowanych danych sorpcji, na globalnie znormalizowanych parametrach gleby. Niektóre wytyczne dotyczące istniejących standardowych metod analiz gleby i jej charakterystykę podano w bibliografii (50–52). W odniesieniu do kalibracji metod badania gleby zalecane jest stosowanie gleb odniesienia.

Wytyczne dotyczące wyboru gleb do doświadczeń adsorpcja/desorpcja podano w tabeli 1. Siedem wybranych gleb pokrywa typy gleb spotykane w różnych strefach geograficznych. Dla podatnych na jonizację substancji badanych wybrane gleby powinny pokrywać szeroki zakres pH, w celu umożliwienia oceny adsorpcji substancji w jej zjonizowanych i niezjonizowanych formach. Wytyczne dotyczące tego jak wiele różnych gleb należy użyć na różnych stadiach badania podano pod 1.9 „Wykonanie badania”.

Jeśli inne typy gleb są preferowane powinny one charakteryzować się tymi samymi parametrami i powinny mieć zbliżone zmiany we właściwościach do tych opisanych w tabeli 1, nawet jeśli nie zestawiają one dokładnie kryteriów.

▼B

Tabela 1

Wytyczne dotyczące wyboru próbek gleby dla adsorpcji/desorpcji

Typ gleby	Zakres pH (w 0,01 M $CaCl_2$)	Zawartość węgla organicznego (%)	Zawartość gliny (%)	Tekstura gleby ([1])
1	4,5–5,5	1,0–2,0	65–80	glina
2	> 7,5	3,5–5,0	20–40	glina formierska
3	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	mul formierski
4	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	ił
5	< 4,0–6,0 ([2])	< 0,5–1,5 ([2]) ([3])	< 10–15 ([2])	piasek formierski
6	> 7,0	< 0,5–1,0 ([2]) ([3])	40–65	glina ił/glina
7	< 4,5	> 10	< 10	piasek/piasek formierski

([1]) Zgodnie z FAO I systemem US (85).
([2]) Odpowiednie zmienne powinny wykazywać wartości w ramach podanego zakresu. Jednakże jeśli występują trudności ze znalezieniem właściwego materiału gleby, wartości poniżej wskazują akceptowalne minimum.
([3]) Gleby z mniej niż 0,3 % węgla organicznego mogą zakłócać korelację między organiczną zawartością a adsorpcją. Jest zalecane użycie gleb o minimalnej zawartości węgla organicznego 0,3 %.

1.7.3. **Zbieranie i przechowywanie próbek gleby**

1.7.3.1. *Zbieranie*

Nie ma specjalnych technik ani narzędzi zalecanych do pobierania próbek; technika pobierania próbek zależy od celu badania (53)(54)(55)(56)(57)(58).

Należy rozważyć:

a) szczegółowe informacje dotyczące historii pola jest konieczne, obejmuje to umiejscowienie, rodzaje wegetacji, traktowanie pestycydami i/lub nawozami, dodatki biologiczne lub przypadkowe zanieczyszczenia. Zalecenia normy ISO dotyczące pobierania próbek (ISO 10381-6) powinny zostać spełnione w odniesienia do opisu miejsca pobierania próbek;

b) miejsce pobierania próbek musi być określone przez UTM (uniwersalne poprzeczne odwzorowanie Mercatora – europejski poziom geodezyjny) lub współrzedne geograficzne; może to umożliwić ponowne zebranie określonej gleby w przyszłości lub może pomóc w określeniu gleby w różnych systemach klasyfikacyjnych używanych w różnych krajach Zbierana powinna być gleba z poziomu A do maksymalnej głębokości do 20 cm. W szczególności w odniesieniu do gleb typu n. 7, jeśli poziom O_h jest obecny jako część gleby, która powinna być włączona przy zbieraniu próbek.

Próbki gleby powinny być przetransportowane z użyciem pojemników i w warunkach temperatury, które zapewniają, aby początkowe właściwości gleby nie zostały zmienione w znaczący sposób.

▼B

1.7.3.2. *Przechowywanie*

Zalecane jest użycie tylko świeżo pobranych gleb z pola. Tylko w przypadkach, gdy jest to niemożliwe, gleba jest przechowywana w temperaturze otoczenia oraz powinna być wysuszona powietrzem. Nie ma zalecanej granicy czasu przechowywania, lecz gleby przechowywane dłużej niż trzy lata powinny być ponownie przeanalizowane przed użyciem w odniesieniu do ich zawartości węgla organicznego, pH i CEC.

1.7.3.3. *Postępowanie i przygotowanie próbek gleby do badań*

Gleby są suszone powietrzem w temperaturze otoczenia (zalecane 20–25 ^{o}C). Rozdrobnienie powinno być prowadzone z minimalną siłą, tak aby pierwotna tekstura gleby zmieniła się tak niewiele, jak to możliwe. Gleby przesiewa się do wielkości cząstki < 2 mm; zalecenia normy ISO dotyczące pobierania próbek gleby (ISO 10381-6) powinny być spełnione w odniesieniu do procesu przesiewania. Zalecana jest staranna homogenizacja, gdyż poprawia to odtwarzalność wyników. Zawartość wilgoci w każdej glebie jest określana z trzech podwielokrotności ogrzewanych w temperaturze 105 ^{o}C do zaniku występowania znaczących różnic wagi (około 12 godzin). W odniesieniu do wszystkich obliczeń masa gleby oznacza wysuszoną w suszarce suchą masę, tj. wagę gleby skorygowaną o zawartość wilgoci.

1.7.4. **Przygotowanie substancji użytej w badaniu do zastosowania na glebę**

Substancja badana jest rozpuszczona w roztworze 0,01 M $CaCl_2$ w destylowanej lub dejonizowanej wodzie; roztwór $CaCl_2$ stosuje się jako rozpuszczalnik fazy wodnej do poprawy odwirowania i zminimalizowania wymiany kationowej. Zalecane stężenie roztworu podstawowego powinno być trzy rzędy wyższe niż granica wykrywalności stosowanej metody analitycznej. Niniejszy próg gwarantuje dokładne pomiary w odniesieniu do metodologii stosowanej w niniejszej metodzie; ponadto stężenie roztworu podstawowego powinno być poniżej rozpuszczalności w wodzie badanej substancji.

Roztwór podstawowy powinien być przygotowany tuż przed zastosowaniem do próbek gleby oraz powinien być on trzymany zamknięty w ciemności w 4 ^{o}C. Czas przechowywania zależy od stabilności substancji badanej i jej stężenia w roztworze.

Tylko w odniesieniu do słabo rozpuszczalnych substancji ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), gdy trudno rozpuścić substancję badaną, potrzebny może być środek ułatwiający rozpuszczenie. Środek ułatwiający rozpuszczenie: a) powinien być mieszalny z wodą, jak też z metanolem lub acetonitrylem; b) jego stężenie nie powinno przekraczać 1 % całkowitej objętości roztworu podstawowego i powinno stanowić mniej niż to w roztworze substancji badanej, która wchodzi w kontakt z glebą (zalecany mniej niż 0,1 %); oraz c) nie powinien być środkiem powierzchniowo czynnym lub ulegać solwolitycznym reakcjom z badaną substancją. Użycie środka ułatwiającego rozpuszczanie powinno być przewidziane i usprawiedliwione przy przedstawianiu danych.

Inną alternatywą dla słabo rozpuszczalnych substancji jest dodanie substancji badanej do systemu badanego przez wybijanie: substancja badana jest rozpuszczona w organicznym rozpuszczalniku, jej podwielokrotność do systemu gleby a 0,01 M roztworu $CaCl_2$ w destylowanej lub dejonizowanej wodzie. Zawartość rozpuszczalnika w fazie wodnej powinna być tak niska jak to możliwe, zwykle nie przekracza 0,1 %. Wybijanie z roztworu organicznego może ulec objętościowej nieodtwarzalności. Dlatego wprowadza się dodatkowy błąd, tak że stężenie substancji badanej i korozpuszczalnika nie jest takie samo we wszystkich badaniach.

▼B

1.8. WARUNKI WSTĘPNE PRZEPROWADZANIA BADANIA ADSORPCJI/DESORPCJI

1.8.1. **Metoda analityczna**

Kluczowe parametry wpływające na dokładność pomiarów sorpcji obejmują: dokładność metody analitycznej w analizie obu roztworów i faz adsorbowanych, stabilność i czystość substancji badanej, osiągnięcie równowagi sorpcji, rozpiętość zmian stężenia roztworu, stosunek gleba/roztwór i zmiany w strukturze gleby w czasie trwania procesu równowagi (35)(59–62). Niektóre przykłady dotyczące danych dokładności podano w dodatku 2.

Wiarygodność używanej metody analitycznej musi być sprawdzona w zakresie stężeń, które prawdopodobnie wynikną w trakcie badania. Eksperymentator powinien czuć się swobodnie, aby rozwijać odpowiednie metody z właściwą dokładnością, precyzją, odtwarzalnością, granicami wykrywalności i je poprawiać. Wytyczne dotyczące tego w jaki sposób należy prowadzić takie badania podano w doświadczeniu poniżej.

Właściwa objętość 0,01 M $CaCl_2$, np. 100 cm^3, jest mieszana w ciągu 4 godz. z odważką gleby, np. 20 g, o wysokiej adsorbowalności, tj. z wysoką zawartością węgla organicznego oraz gliny; te odważki i wielkości zmieniają się w zależności od potrzeb analitycznych, lecz stosunek gleba/roztwór wynoszący 1:5 jest dogodnym punktem początkowym. Mieszaninę odwirowuje się, a fazę wodną filtruje. Pewną objętość roztworu podstawowego substancji badanej dodaje się do drugiej dla uzyskania nominalnego stężenia, w zakresie stężenia, które prawdopodobnie wystąpi w czasie trwania badania. Objętość ta nie powinna przekraczać 10 % końcowej objętości fazy wodnej, w celu zmiany w najmniejszym możliwym zakresie charakteru roztworu przedrównowagowego. Roztwór poddaje się analizie.

Ślepa próba, składająca się z systemu gleba + roztwór $CaCl_2$ (bez substancji badanej), musi być włączona w celu sprawdzenia artefaktów w metodzie analitycznej oraz dla macierzystych efektów powodowanych przez glebę.

Analityczne metody, które mogą być stosowane do pomiarów sorpcji zawierają chromatografię gazowo-cieczową (GLC), wysokiej rozdzielczości chromatografię cieczową (HPLC), spektrometrię (np. spektrometria GC/masa, spektrometria HPLC/masa) i cieczową scyntylacyjną (w odniesieniu do substancji etykietowanych izotopami). Niezależnie od używanych metod analitycznych, jest uznane za odpowiednie, jeśli wykrywalność wynosi między 90 a 110 % wartości nominalnej. W celu umożliwienia wykrycia oraz oceny po zajściu podziału granice wykrywalności metody analitycznej powinny być co najmniej dwa rzędy wielkości, poniżej stężenia nominalnego.

Cechy i granice wykrywalności metody analitycznej dostępnej do przeprowadzenia badań adsorpcji mają istotną rolę w określaniu warunków badania i całego doświadczalnego przeprowadzenia badania. Niniejsza metoda wskazuje ogólną doświadczalną drogę, dostarcza zaleceń i wytycznych dotyczących rozwiązań alternatywnych, w przypadku gdy metoda analityczna i laboratoryjne środki mogą nakładać ograniczenia.

▼B

1.8.2. **Wybór optymalnych proporcji gleba/roztwór**

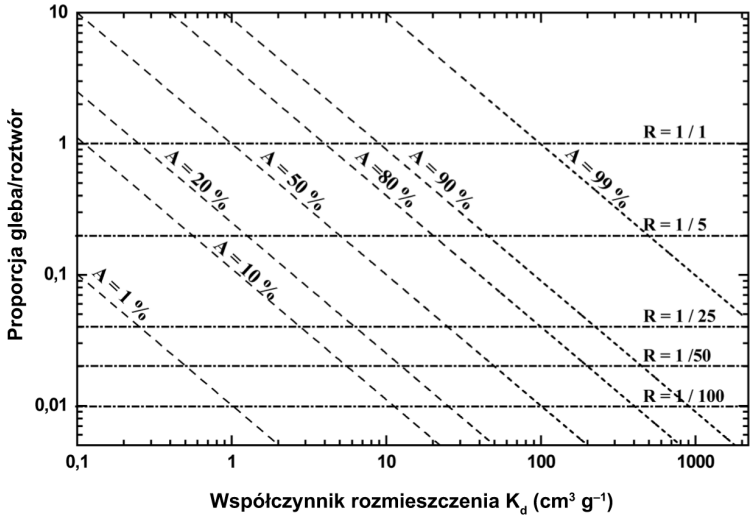
Wybór właściwych proporcji gleby do roztworu w badaniach sorpcji zależy od współczynnika podziału K_d oraz względnego stopnia pożądanej adsorpcji. Zmiana stężenia substancji w roztworze określa statystyczną dokładność pomiaru opartego na kształcie równania adsorpcji i granicy analitycznej metodologii w wykrywaniu stężenia substancji chemicznej w roztworze. Dlatego w praktyce ogólnej jest użyteczne ustalenie kilku proporcji, w odniesieniu do których procent adsorpcji wynosi powyżej 20 %, a zalecany > 50 % (62), ponieważ należy dążyć do utrzymania stężenia substancji badanej w wodnej fazie wystarczająco wysoko, aby mogło być ono zmierzone dokładnie. Jest to szczególnie istotne w przypadku wysokiego procentu adsorpcji.

Dogodne podejście do wyboru właściwej proporcji gleba/woda jest oparte na szacowaniu wartości K_d przez badania wstępne albo przez ustalone techniki szacowania (dodatek 3). Wybór właściwej proporcji dokonywany jest w oparciu o wykres proporcji gleba/roztwór w zależności od K_d w odniesieniu do ustalonego procenta adsorpcji (rys. 1). W tym wykresie przyjęto, że równanie adsorpcji jest liniowe ([1]). Stosowana zależność jest uzyskiwana przez przekształcenie równania (4) dla K_d do postaci równania (1):

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \qquad (1)$$

lub w jego postaci logarytmicznej, przyjmując ze $R = m_{soil}/V_0$ i $A_{eq}\,\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{A_{eq}\%/100}{1 - A_{eq}\%/100} \right] \qquad (2)$$



Rys. 1. Zależność między stosunkami gleba do roztworu i K_d przy różnych procentach zaadsorbowanej substancji badanej

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

▼B

Rysunek 1 przedstawia proporcje gleba/roztwór jako funkcje K_d dla różnych poziomów adsorpcji. Na przykład przy proporcji gleba/roztwór 1:5 i K_d 20 zachodzi w przybliżeniu 80 % adsorpcji. Dla uzyskania 50 % adsorpcji dla tego samego Kd należy zastosować proporcję 1:25. Takie podejście do wyboru właściwych proporcji gleba/roztwór daje badaczowi elastyczność w spełnieniu doświadczalnych wymagań.

Dziedziny, które są trudniejsze do rozwiązania, są tymi, w których substancja chemiczna jest wysoce adsorbowana lub bardzo nieznacznie. W przypadku występowania niskiej adsorpcji stosunek 1:1 gleba/roztwór jest zalecany, chociaż w odniesieniu do niektórych bardzo organicznych typów gleb, konieczne są mniejsze proporcje do uzyskania zawiesiny. Analityczna metodologia do pomiaru małych zmian stężeń w roztworach musi być stosowana z ostrożnością; inaczej pomiar adsorpcji będzie niedokładny. Z drugiej strony, bardzo wysokie współczynniki podziału K_d, dochodzące do 1:100 stosunek gleba/roztwór w celu pozostawienia znaczącej ilości substancji w roztworze. Jednakże należy zwrócić uwagę na zapewnienie dobrego mieszania oraz odpowiedniego czasu na dojście systemu do równowagi. Alternatywnym podejściem do rozwiązania takich ekstremalnych przypadków, gdy brakuje stosownej metodologii analitycznej, jest przewidywanie wartości K_d w zastosowaniu technik oceny, opartych na przykład, o wartości P_{ow} (dodatek 3). Może to być przydatne w szczególności w odniesieniu do nisko adsorbowalnych polarnych substancji chemicznych o $P_{ow} < 20$ oraz dla lipofilowych, wysoce sorpcyjnych substancji o $P_{ow} > 10^4$.

1.9. WYKONANIE BADANIA

1.9.1. **Warunki badania**

Wszystkie doświadczenia są wykonywane w temperaturze otoczenia oraz, jeśli to możliwe, w stałej temperaturze między 20 a 25 °C.

Warunki odwirowania powinny umożliwić usunięcie z roztworu cząstek większych niż 0,2 μm. Ta wartość oddziela cząstki najmniejszych rozmiarów, uważanych za cząstkę stałą i jest granicą między stałą i koloidalną cząstką. Wytyczne dotyczące sposobu określania warunków odwirowania podano w dodatku 4.

Jeśli udogodnienia w zakresie odwirowania nie mogą zapewnić usunięcia cząstek większych od 0,2 μm, stosowana może być kombinacja odwirowania oraz filtracji przez filtr 0,2 μm. Filtry te powinny być wykonane z odpowiedniego obojętnego materiału, zapobiegającego stratom na nim. W każdym przypadku należy udowodnić, że nie powstają na nim jakiekolwiek straty substancji badanej podczas trwania filtracji.

1.9.2. **Warstwa 1 – Badania wstępne**

Cel prowadzenia badań wstępnych podano już w punkcie dotyczącym zakresu. Wytyczne dotyczące określania takiego badania wraz z doświadczeniem sugerowanym podano poniżej.

1.9.2.1. *Wybór optymalnych proporcji gleba/roztwór*

Używa się dwa typy gleby i trzy proporcje gleba/roztwór (sześć doświadczeń). Jeden rodzaj gleby ma wysoką zawartość węgla organicznego i gliny, druga niską zawartość węgla organicznego i gliny. Sugerowane są następujące proporcje gleby do roztworu:

— 50 g gleby i 50 cm^3 roztworu wodnego substancji badanej (proporcja 1/1),

▼B

— 10 g gleby i 50 cm^3 roztworu wodnego substancji badanej (proporcja 1/5),

— 2 g gleby i 50 cm^3 roztworu wodnego substancji badanej (proporcja 1/25).

Minimalna ilość gleby, przy której przeprowadza się doświadczenie, zależy od możliwości laboratorium i wykonania zastosowanych metod analitycznych. Jednakże jest zalecane użycie co najmniej 1 g, a najlepiej 2 g, w celu uzyskania wiarygodnych wyników badania.

Jedna próbka kontrolna jedynie z substancją badaną w roztworze 0,01 M $CaCl_2$ (bez gleby) podlega dokładnie tym samym kolejnym czynnościom jak badane systemy, w celu sprawdzenia stabilności badanej substancji w roztworze $CaCl_2$ i możliwej adsorpcji na powierzchni badanego zbiornika.

Ślepa próba gleby z taką samą ilością gleby i całkowitej objętości 50 cm^3 roztworu 0,01 M $CaCl_2$ (bez substancji badanej) podlega takiej samej procedurze badania. Służy to jako dodatkowa kontrola w czasie trwania analizy mającej na celu wykrycie zakłócających substancji lub zanieczyszczonych gleb.

Wszystkie doświadczenia, łącznie z próbami ślepymi i kontrolnymi, powinny być wykonane przynajmniej z duplikatem. Całkowita ilość próbek które powinny być przygotowane dla badań mogą być obliczone w odniesieniu do metodologii, która zastanie zastosowana.

Metody w zakresie badań wstępnych i badania główne są ogólnie takie same, wyjątki są wspomniane tam, gdzie to jest odpowiednie.

Wysuszone powietrzem próbki gleby są równoważone przez wytrząsanie minimalną objętością 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ w ciągu nocy (12 godz.) przed dniem doświadczenia. Następnie dodaje się pewną ilość roztworu podstawowego substancji badanej w celu dostosowania końcowej objętości do 50 cm^3. Objętość dodanego roztworu podstawowego: a) nie powinna przekroczyć 10 % końcowej objętości 50 cm^3 fazy wodnej w celu zmiany, w możliwie najmniejszym zakresie charakteru roztworu przed równowagą; oraz b) powinna zdecydowanie wpływać na wyniki początkowego stężenia substancji badanej będącej w kontakcie z glebą (C_0) co najmniej dwa rzędy wielkości więcej niż granica wykrywalności metody analitycznej; niniejszy próg zabezpiecza możliwość prowadzenia dokładnych pomiarów nawet gdy zachodzi silne adsorpcja (> 90 %) i określenia późniejszych izoterm adsorpcji. Zaleca się również, jeśli to możliwe, aby początkowe stężenie substancji (C_0) nie przekraczało połowy jej granicy rozpuszczalności.

Przykład sposobu obliczenia stężenia roztworu podstawowego (C_{st}) podano poniżej. Przyjęto granicę wykrywalności 0,01 μg cm-^{3} i 90 % adsorpcji; zatem zalecane wstępne stężenie substancji badanej w kontakcie z glebą powinno wynosić l μg cm-^{3} (dwa rzędy wielkości wyższe niż granica wykrywalności). O ile dodano zalecaną maksymalną objętość roztworu podstawowego, tj 5–45 $cm^3$0,01 M $CaCl_2$ roztworowa równowaga (= 10 % roztworu podstawowego do 50 cm^3 całkowitej objętości fazy wodnej), stężenie roztworu podstawowego powinno wynosić 10 μg cm^{-3}; to jest trzy rzędy wielkości wyższej niż granica wykrywalności metody analitycznej.

Wartość pH fazy wodnej powinna być mierzona przed i po kontakcie z glebą, ponieważ ma to istotne znaczenie w całkowitym procesie adsorpcji, w szczególności w odniesieniu do jonizowalnych substancji.

▼B

Mieszanina jest wytrząsana do osiągnięcia równowagi adsorpcji. Czas równowagi w glebach jest wysoce zmienny w zależności od substancji chemicznej i gleby; okres 24 godzin jest ogólnie wystarczający (77). W badaniach wstępnych próbki mogą być zbierane sekwencyjnie przez 48 godzin okresu mieszania (np. w 4, 8, 24, 48 godzin). Jednakże czas analizy powinien być określony elastycznie w odniesieniu do rozkładu pracy laboratorium.

Istnieją dwie możliwości w odniesieniu do analizy substancji badanej w roztworze wodnym: a) metoda równoległa; i b) metoda seryjna. Należy pokreślić, że chociaż metoda równoległa jest doświadczalnie bardziej uciążliwa, to matematyczne opracowanie wyników jest prostsze (dodatek 5). Jednakże wybór metodologii która ma być zastosowana pozostawiona jest eksperymentatorowi, który musi rozważyć dostępne urządzania i zasoby laboratorium.

a) Metoda równoległa: przygotowuje się próbki w tej samej proporcji gleba/roztwór, w liczbie zależnej od tego w ilu przedziałach czasowych chce się zbadać kinetykę adsorpcji. Po odwirowaniu i jeśli jest to pożądane, po filtracji faza wodna z pierwszej probówki jest usuwana możliwie całkowicie i mierzona po, na przykład 4 godzinach, druga probówka po 8 godzinach, trzecia po 24 godzinach itd.

b) Metoda seryjna: przygotowuje się tylko kopie próbek odniesieniu do każdej proporcji gleba/roztwór. W określonych przedziałach czasu mieszanina jest wirowana w celu rozdzielenia faz. Mała podwielokrotność fazy wodnej jest niezwłocznie analizowana w odniesieniu do substancji badanej; następnie doświadczenie prowadzi się nadal z oryginalną mieszaniną. Jeśli zastosowano filtrację po odwirowaniu, laboratorium powinno posiadać urządzenia umożliwiające przeprowadzenie filtracji małych wodnych podwielokrotności. Zalecane jest, aby całkowite podwielokrotności pobrane nie przekraczały 1 % całkowitej objętości roztworu, w celu nie powodowania znaczących zmian proporcji gleba/roztwór i zmniejszenia masy rozpuszczonej zdolnej do adsorpcji w czasie trwania badania.

Procentowa adsorpcja A_{t_i} jest obliczana w każdym punkcie czasu (t_i) na podstawie nominalnego początkowego stężenia i zmierzonego stężenia w chwili pobierania próbek (t_i), skorygowana w odniesieniu do wartości ślepej próby. Wykresy A_{t_i} w zależności od czasu (rys. 1 dodatek 5) są generowane w celu oszacowania osiągnięcia plateau równowagowego ([1]). Wartość K_d w równowadze jest również obliczana. W oparciu o tę wartość K_d, właściwe proporcje gleba/roztwór są wybierane z rys. l, tak aby procent adsorpcji osiągał powyżej 20 %, a zalecane > 50 % (61). Wszystkie mające zastosowanie równania i zasady wykreślania podano w punkcie „Dane i sprawozdawczość” oraz w dodatku 5.

1.9.2.2. *Określenie czasu równowagi adsorpcji i ilości badanej substancji zaadsorbowanej w równowadze*

Jak już wspomniano, wykresy A_{t_i} lub C_{aq}^{ads} w zależności od czasu pozwalają oszacować osiągnięcie równowagi adsorpcji i ilości badanej substancji zaadsorbowanej w równowadze. Rysunki 1 i 2 w dodatku 5 wskazują przykłady takich wykresów. Czas równowagi jest czasem potrzebnym systemowi do osiągnięcia plateau.

([1]) Krzywa stężenia substancji badanej fazie wodnej (C_{aq}^{ads}) w zależności od czasu może być również wykorzystana do oszacowania osiągnięcia plateau równowagowego (zob. rys. 2 w dodatku 5).

▼B

Jeśli przy określonej glebie nie występuje plateau, tylko stały wzrost, może być to spowodowane czynnikami zakłócającymi, takimi jak biodegradacja lub powolne rozproszenie. Biodegradacja może być wykazana przez powtórzenie doświadczenia ze sterylizowaną próbką gleby. Jeśli nie uzyskano plateau nawet w tym przypadku, eksperymentator powinien poszukiwać innych zjawisk, które mogły wpłynąć na to szczególne badanie; może to być dokonane z właściwymi zmianami warunków doświadczenia (temperatura, czas wytrząsania, proporcje gleba/roztwór). Pozostawia się do uznania ekperymentatora, czy stosować nadal procedurę badania pomimo możliwosci nieuzyskania równowagi.

1.9.2.3. *Adsorpcja na powierzchni zbiornika badanego i stabilność substancji użytej w badaniu*

Niektóre informacje dotyczące adsorpcji substancji badanej na powierzchni badanego zbiornika, jak również dotyczące jej stabilności są wyprowadzane poprzez analizowanie próbek kontrolnych. Jeżeli obserwuje się uszczuplenie większe niż standardowy błąd metody analitycznej, może to świadczyć o abiotycznej degradacji i/lub adsorpcji na powierzchni badanego zbiornika. Rozróżnienie między tymi dwoma zjawiskami może być uzyskane przez gruntowne mycie ścian zbiornika znaną ilością właściwego rozpuszczalnika oraz przez poddanie roztworu z mycia analizie w odniesieniu do substancji badanej. Jeśli nie obserwuje się adsorpcji na powierzchni zbiornika badanego, uszczuplenie oznacza abiotyczną niestabilność substancji badanej. Jeśli wykryto adsorpcję, konieczna jest zmiana materiału zbiornika badanego. Jednakże danych dotyczących adsorpcji na powierzchni badanego zbiornika, uzyskanych w wyniku tego doświadczenia nie można bezpośrednio ekstrapolować do doświadczenia gleba/roztwór. Obecność gleby oddziaływuje na tę adsorpcję.

Dodatkowe informacje dotyczące stabilności substancji badanej mogą być uzyskane przez określenie macierzystego bilansu masy w czasie. Oznacza to, że faza wodna, ekstrakt z gleby i ścianki zbiornika badanego są analizowane w odniesieniu do substancji badanej. Różnica między masą badanych substancji chemicznych dodanych a sumą mas badanych substancji chemicznych w fazie wodnej, ekstraktów z gleby i ścianek zbiornika badanego jest równa masie zdegradowanej i/lub ulotnionej i/lub nieekstrahowanej. W celu dokonania określenia bilansu masy równowaga adsorpcyjna powinna być osiągnięta w czasie doświadczenia.

Bilans masy wykonuje się na obu glebach i w odniesieniu do jednej proporcji gleba/roztwór na glebę, co daje uszczuplenie ponad 20 % i zalecane > 50 % w równowadze. Po zakończeniu doświadczenia znalezienia proporcji z analizą ostatniej próbki wodnej fazy po 48 godzinach, fazy są rozdzielane przez odwirowanie i, jeśli jest to pożądane, filtrowane. Faza wodna jest w najszerszym możliwym zakresie odzyskiwana oraz dodany jest odpowiedni rozpuszczalnik ekstrakcyjny (współczynnik ekstrakcji co najmniej 95 %) do gleby, aby wyekstrahować substancję badaną. Zaleca się co najmniej dwie kolejne ekstrakcje. Ilość substancji badanej w ekstrakcie z gleby i zbiornika badanego jest określana, a bilans masy oblicza się (równanie 10, Dane i sprawozdawczość). Jeżeli jest mniejszy niż 90 %, substancję badaną uznaje się za niestabilną w skali czasu badania. Jednakże badania mogą nadal być prowadzone, uwzględniając niestabilność substancji badanej, w tym przypadku zalecane jest analizowanie obu faz w badaniu głównym.

▼B

1.9.2.4. *Warstwa 2 – Kinetyka adsorpcji przy jednym stężeniu substancji badanej*

Stosuje się pięć typów gleb, wybranych z tabeli 1. Zaletą jest, że można włączyć niektóre lub wszystkie gleby użyte w badaniach wstępnych, jeśli to stosowne, spośród tych pięciu gleb. W tym przypadku warstwa 2 nie zostaje powtórzona w odniesieniu do gleb użytych w badaniach wstępnych.

Czas równowagi, stosunek gleba/roztwór, waga próbki gleby, objętość fazy wodnej w kontakcie z glebą oraz stężenie substancji badanej w roztworze są wybierane w oparciu o wyniki badań wstępnych. Zalecane jest, aby analiza została wykonana po około 2, 4, 6, 8 (możliwie także 10) i 24 godz. czasu kontaktu; czas mieszania może być przedłużony do maksimum 48 godz. w przypadku substancji chemicznej wymagającej dłuższego czasu równowagi w odniesieniu do wyników poszukiwania proporcji. Jednakże czas analizy należy rozważyć elastycznie.

Każde doświadczenie (jedna gleba i jeden roztwór) jest co najmniej raz kopiowane, aby umożliwić oszacowanie odchylenia wyników. W każde doświadczenie włączona jest ślepa próba. Obejmuje to glebę i roztwór 0,01 M $CaCl_2$, bez substancji badanej, odpowiednio wagę oraz objętość identyczne do tych z doświadczenia. Kontrolna próbka tylko z substancją badaną w roztworze 0,01 M $CaCl_2$ (bez gleby) podlega tej samej procedurze badania, służąc jako zabezpieczenie przed nieoczekiwanym.

Procent adsorpcji jest obliczany w każdym punkcie czasu A_{t_i} i/lub przedziale czasowym $A_{\Delta t_i}$ (wedle potrzeby) i jest wykreślany w zależności od czasu. Współczynnik podziału K_d w równowadze, jak również znormalizowany współczynnik adsorpcji węgla organicznego K_{oc} (w odniesieniu do niepolarnych substancji chemicznych organicznych) są również obliczane.

Wyniki badania adsorpcji kinetycznej

Liniowa wartość Kd jest zasadniczo dokładna aby opisać zachowanie sorpcyjne w glebie (35)(78) i przedstawia wyrażenie mobilności właściwej substancji chemicznych w glebie. Na przykład ogólnie w substancjach chemicznych o $K_d < 1\ cm^3\ g^{-1}$ są uznawane za jakościowo mobilne. Podobnie, schemat klasyfikacji mobilności oparty o wartości K_{oc} został rozwinięty przez MacCall *et al.* (16). Dodatkowo, schematy klasyfikacji wypłukiwania istnieją w oparciu o zależność między K_{oc} a DT-50 ([1]) (32)(79).

Również, zgodnie z badaniami analizy błędów (61), wartości K_d poniżej $0,3\ cm^3\ g^{-1}$ nie można oszacować dokładnie z obniżenia stężenia w fazie wodnej, nawet jeżeli zastosowano najbardziej korzystny (z punktu widzenia dokładności) stosunek gleba/roztwór, tj. 1:1. Zaleca się w tym przypadku analizę obu faz, gleby i roztworu.

([1]) DT-50: czas degradacji dla 50 % badanej substancji.

▼B

W odniesieniu do powyższych uwag jest zalecane, aby badania zachowania adsorpcyjnego substancji chemicznych w glebie i ich potencjalna mobilność były nadal prowadzone przez oznaczanie izoterm adsorpcji Freundlicha dla tych systemów, dla których możliwe jest oznaczenie K_d, wraz z protokołem doświadczalnym zastosowanym w niniejszej metodzie badania. Dokładne oznaczenie jest możliwe jeżeli wartość, która wynika z pomnożenia K_d i proporcji gleba/roztwór jest > 0,3, gdy pomiary są oparte na spadku stężenia w wodnej fazie (metoda pośrednia), lub > 0,1, gdy analizowane są obie fazy (metoda bezpośrednia) (61).

1.9.2.5. *Warstwa 3 – Izotermy adsorpcji i kinetyka desorpcji/izotermy desorpcji*

1.9.2.5.1. Izotermy adsorpcji

Używa się pięć stężeń substancji badanej, obejmujące najlepiej dwa rzędy wielkości; przy wyborze tych stężeń powinny być uwzględnione rozpuszczalność w wodzie i wynikła stężeniowa równowaga wodną. W trakcie badań musi być zachowany ten sam stosunek gleba/roztwór. Badanie adsorpcji jest prowadzone, jak opisano powyżej, z tą tylko różnicą, że faza wodna jest analizowana tylko raz w czasie niezbędnym do osiągnięcia równowagi, jak ustalono wcześniej w warstwie 2. Stężenia równowagowe w roztworze są określone, a ilość zaadsorbowana jest obliczona z uszczuplenia substancji badanej w roztworze lub metodą bezpośrednią. Zaadsorbowana masa na jednostkę masy gleby jest wykreślana jako funkcja stężenia równowagi badanej substancji (zob. Dane i sprawozdawczość).

Wyniki z doświadczenia izoterm adsorpcji

Z matematycznych modeli adsorpcji dotąd proponowanych, izoterma Freundlicha jest jedną z najczęściej stosowanych do opisu procesów adsorpcji. Bardziej szczegółowe informacje dotyczące interpretacji i ważności modelu adsorpcji są określone w bibliografii (41) (45)(80)(81)(82).

Uwaga: Należy wspomnieć, że porównanie wartości K_F (współczynnik adsorpcji Freundlicha) w odniesieniu do różnych substancji jest tylko możliwe, gdy te wartości K_F są wyrażone w tych samych jednostkach (83).

1.9.2.5.2. Kinetyka desorpcji

Celem tego doświadczenia jest zbadanie, czy substancja chemiczna jest odwracalnie czy nieodwracalnie adsorbowana w glebie. Niniejsza informacja jest istotna ponieważ proces desorpcji również ma istotne znaczenie w zachowaniu się substancji chemicznych w glebie pól. Ponadto dane w zakresie desorpcji są użyteczne jako dane wejściowe w komputerowym modelowaniu symulacji przebiegu rozpuszczania i płukania. Jeśli badania desorpcji są pożądane, jest zalecane, aby badania opisane poniżej były prowadzone na każdym systemie, dla którego dokładne oznaczenie K_d w poprzedzającym doświadczenie kinetyki adsorpcji było możliwe.

Podobnie jak w badaniach kinetyki adsorpcji, istnieją dwie możliwości wykonania doświadczenia kinetyki desorpcji: a) metoda równoległa; i b) metoda seryjna. Wybór zastosowanej metodologii pozostawia się uznaniu eksperymentatora, który musi uwzględnić dostępne urządzenia i zasoby laboratorium.

▼B

a) Metoda równoległa: w odniesieniu do każdej gleby wybranej do przeprowadzenia badań desorpcji, przygotowuje się próbki o tym samym proporcji gleba/roztwór, w liczbie zależnej od tego w ilu przedziałach czasowych chce się zbadać kinetyki desorpcji. Powinno się użyć tych samych przedziałów czasowych jak w doświadczeniu kinetyki adsorpcji; jednakże całkowity czas może być przedłużony, jeśli to właściwe, w celu osiągnięcia przez system równowagi desorpcji. W każdym doświadczeniu (jedna gleba, jeden roztwór) włącza się ślepą próbę. Obejmuje to glebę i roztwór 0,01 M $CaCl_2$, bez substancji badanej, odpowiednio naważkę oraz objętość identyczne do tych z doświadczenia. Kontrolna próbka tylko z substancją badaną w roztworze 0,01 M $CaCl_2$ (bez gleby) podlega tej samej procedurze badania. Wszystkie mieszaniny gleby z roztworem są mieszane do osiągnięcia równowagi adsorpcji (jak wcześniej określono w warstwie 2). Następnie fazy są rozdzielane przez odwirowanie, a fazy wodne są usuwane w najszerszym możliwym zakresie. Objętość oddzielonego roztworu jest zastępowana przez równą objętość 0,01 M $CaCl_2$ bez substancji badanej, a nowe mieszaniny są ponownie mieszane. Faza wodna z pierwszej probówki jest usuwana całkowicie, jak to możliwe i mierzona po, na przykład 2 godz., druga probówka po 4 godzinach, trzecia po 6 godzinach itd. do osiągnięcia równowagi desorpcji.

b) Metoda seryjna: po doświadczeniu kinetyki adsorpcji, mieszanina jest odwirowana i faza wodna jest usuwana w najszerszym możliwym zakresie. Objętość roztworu usuniętego jest zastępowana przez równą objętość 0,01 M $CaCl_2$ bez substancji badanej. Nowa mieszanina jest mieszana do osiągnięcia równowagi desorpcji. W trakcie tego okresu czasu, w określonych przedziałach czasowych, mieszanina jest odwirowywana w celu rozdzielenia faz. Mała podwielokrotność fazy wodnej jest niezwłocznie analizowana w odniesieniu do substancji badanej; następnie doświadczenie prowadzi się nadal z pierwotną mieszaniną. Objętość każdej poszczególnej podwielokrotności powinna być mniejsza niż 1 % całkowitej objetości. Taka sama ilość świeżego roztworu 0,01 M $CaCl_2$ jest dodawana do mieszaniny w celu utrzymania proporcji gleby do roztworu a mieszanie jest kontynuowane do następnego przedziału czasowego.

Procent desorpcji jest obliczany w każdym punkcie czasu ((D_{t_i})) i/lub przedziale czasowym ($(D_{\Delta t_i})$) (wedle potrzeb badania) i jest wykreślana w zależności od czasu. Współczynnik desorpcji K_{des} w równowadze jest także obliczany. Wszystkie mające zastosowanie równania podano w dodatku 5 i „Dane i sprawozdawczość”.

Wyniki z doświadczenia kinetyki desorpcji

Wspólne wykreślenie procentu desorpcji D_{t_i} i adsorpcji A_{t_i} w zależności od czasu umożliwia oszacowanie odwracalności procesu adsorpcji. Jeśli równowaga desorpcji jest osiągana nawet w obrębie podwojonego czasu równowagi adsorpcji, a całkowita desorpcja jest większa niż 75 % ilości adsorbowanej, adsorpcja jest uważana za odwracalną.

1.9.2.5.3. Izotermy desorpcji

Izotermy desorpcji Freundlicha są określone na glebach używanych w doświadczeniu izoterm adsorpcji. Badanie desorpcji jest prowadzone jak opisano w punkcie „Kinetyka desorpcji”, z tą tylko różnicą, że faza wodna analizowana jest tylko raz, w równowadze desorpcji. Ilość substancji badanej zdesorbowanej jest obliczana. Zawartość substancji badanej pozostającej zaadsorbowaną na glebie w równowadze desorpcji jest wykreślana jako funkcja stężenia równowagi substancji badanej w roztworze.(zob. Dane i sprawozdawczość oraz dodatek 5).

▼B

2. **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

Dane analityczne są przedstawione w formie tabelarycznej (zob. dodatek 6). Podano poszczególne pomiary i obliczone średnie. Pokazano graficzne przedstawienie izoterm adsorpcji. Dokonanie obliczeń opisano poniżej.

Do celów badania uznaje się, że waga 1 cm^3 roztworu wodnego wynosi 1 g. Stosunek gleba/roztwór wyrażony w jednostkach wag./wag. lub wag./obj. jest tą samą liczbą.

2.1. ADSORPCJA

Adsorpcja (A_{t_i}) jest określona jako procent substancji zaadsorbowanej na glebie w proporcji do ilości na początku badania w warunkach badania. Jeśli substancja badana jest stabilna i nie adsorbuje się w znacznym stopniu na ściankach zbiornika, A_{t_i} oblicza się w każdym punkcie czasu t_i, zgodnie z równaniem:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \qquad (3)$$

gdzie:

A_{t_i} = procent adsorpcji w punkcie czasu t_i (%),

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa substancji badanej zaadsorbowanej na glebie w czasie t_i (μg),

m_0 = masa substancji badanej w probówce badanej, na początku badania (μg).

Szczegółowe informacje dotyczące sposobu obliczenia procenta adsorpcji A_{t_i} dla metody równoległej i seryjnej podano w dodatku 5.

Współczynnik podziału K_d jest proporcją między zawartością substancji w fazie gleby i masowym stężeniem substancji w roztworze wodnym, w warunkach badania, gdy osiągnięta jest równowaga adsorpcji.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

gdzie:

$C_s^{ads}(eq)$ = zawartość substancji zaadsorbowana na glebie w równowadze adsorpcji (μg g^{-1}),

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = stężenie masowe substancji w fazie wodnej w równowadze adsorpcji (μg cm^{-3}). To stężenie jest oznaczone analitycznie, uwzględniając wartości dane w ślepej próbie,

$m_s^{ads}(eq)$ = masa substancji zaadsorbowana na glebie w równowadze adsorpcji (μg),

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa substancji w roztworze w równowadze adsorpcji (μg),

m_{soil} = ilość fazy gleby, wyrażona w suchej masie gleby (g),

V_0 = początkowa objętość fazy wodnej w kontakcie z glebą (cm^3).

Zależność między A_{eq} i K_d jest określona przez:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

gdzie:

A_{eq} = procent adsorpcji w równowadze adsorpcji, %.

Znormalizowany współczynnik adsorpcji węgla organicznego K_{oc} wiąże współczynnik podziału K_d z zawartością węgla organicznego próbki gleby:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC}(cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

gdzie:

% OC = procent węgla organicznego w próbce gleby (g g^{-1}).

Współczynnik K_{oc} przedstawia pojedynczą wartość, która charakteryzuje podzielenie głównie niepolarnych substancji organicznych między węglem organicznym w glebie lub osadzie i wodzie. Adsorpcja tych substancji chemicznych jest skorelowana z zawartością związków organicznych sorbującego ciała stałego (7); zatem wartości K_{oc} zależą od właściwych cech próchnicowych frakcji, które różnią się znacznie zdolnością sorpcji z powodu różnic w pochodzeniu, genezie itd.

2.1.1. **Izotermy adsorpcji**

Równanie izoterm Freundlicha wiąże ilość substancji badanej zaadsorbowanej ze stężeniem substancji badanej w roztworze w równowadze (równanie 8).

Dane są opracowywane jak w „Adsorpcja" i, w odniesieniu do każdej probówki badanej, jest obliczana zawartość substancji badanej zaadsorbowanej na glebie po badaniu adsorpcji ($C_s^{ads}(eq)$, gdzie indziej oznaczane jako as x/m). Przyjmując, że równowaga została osiągnięta i że $C_s^{ads}(eq)$ przedstawia wartość równowagi:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq))\right].V_0}{m_{soil}}(\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Równanie adsorpcji Freundlicha jest wskazane w (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n}(\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

lub w postaci liniowej:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

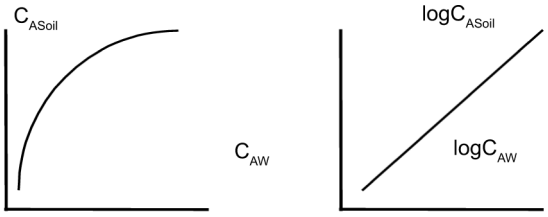
gdzie:

K_F^{ads} = współczynnik adsorpcji Freundlicha; jego wymiarem jest $cm^3\ g^{-1}$ tylko gdy l/n = 1; we wszystkich innych przypadkach nachylenie l/n jest wprowadzone w wymiar K_F^{ads} ($\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$)

n = stała regresji; l/n ogólnego zakresu między 0,7–1,0, wskazując, że dane sorpcji są często lekko nieliniowe.

Równania (8) i (9) są wykreślane i wartościK_F^{ads} i l/n są wyliczane analizą regresyjną, używając równanie 9. Współczynnik korelacji r^2 równania logarytmicznego jest również wyliczany. Przykład takich wykresów podano na rys. 2.

▼B



Rys. 2. Wykres adsorpcji Freundlicha, normalny i linearyzowany

2.1.2. **Bilans masy**

Bilans masy (MB) określa się jako procent substancji, który może być analitycznie odzyskany po badaniu adsorpcji w zależności od nominalnej ilości substancji na początku badania.

Opracowywanie danych rozróżni, czy rozpuszczalnik jest całkowicie mieszalny z wodą. W przypadku rozpuszczalników mieszalnych z wodą opracowanie danych opisanych pod „Desorpcja" może być stosowane do określenia ilości substancji odzyskanej przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem. Jeśli rozpuszczalnik jest słabo mieszalny z wodą, określenie odzyskanej ilości musi być dokonane.

Bilans masy MB w odniesieniu do adsorpcji jest obliczany następująco; przyjmuje się, że pojęcie (mE) odpowiada sumie badanych mas substancji chemicznych wyekstrahowanych z gleby i powierzchni zbiornika badanego, rozpuszczalnikiem organicznym:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

gdzie:

MB = bilans masy (%),

m_E = całkowita masa substancji badanej wyekstrahowanej z gleby i ścian zbiornika badanego w dwóch krokach (μg),

C_0 = początkowe stężenie masowe roztworu badanego w kontakcie z glebą (μg cm^{-3}),

V_{rec} = objętość nadsączu odzyskanego po równowadze adsorpcyjnej (cm^3).

2.2. DESORPCJA

Desorpcję (D) określa się jako procent substancji badanej zdesorbowanej w zależności od ilości substancji uprzednio zaadsorbowanej, w warunkach badania:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

gdzie:

D_{ti} = procent desorpcji w punkcie czasu t_i (%),

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = masa substancji badanej zdesorbowanej z gleby w punkcie czasu t_i (μg),

$m_s^{ads}(eq)$ = masa substancji badanej zaadsorbowanej na glebie w równowadze adsorpcji (μg).

Szczegółowe informacje dotyczące sposobu obliczenia procentu desorpcji D_{ti} dla metody równoległej i seryjnej podano w dodatku 5.

Pozorny współczynnik desorpcji (K_{des}) jest, w warunkach badania, proporcją między zawartością substancji pozostającą w fazie gleby a stężeniem masowym substancji desorbowanej w roztworze wodnym, gdy osiągnięta jest równowaga desorpcji:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

gdzie:

K_{des} = współczynnik desorpcji ($cm^3\ g^{-1}$),

$m_{aq}^{des}(eq)$ = całkowita masa substancji badanej zdesorbowanej z gleby w równowadze desorpcji (μg),

V_T = całkowita objętość fazy wodnej w kontakcie z glebą w czasie trwania badania kinetyki desorpcji (cm^3).

Wytyczne dotyczące obliczania $m_{aq}^{des}(eq)$ podano w dodatku 5 pod pozycją „Desorpcja”.

Uwaga:

Jeśli badanie adsorpcji, które było poprzedzające było wykonane metodą równoległą objętość V_T w równaniu 12 uznaje się za równe V_0.

2.2.1. **Izotermy desorpcji**

Równanie izoterm desorpcji Freundlicha wiąże zawartość substancji badanej pozostającej zaadsorbowanej na glebie, ze stężeniem substancji badanej w roztworze w równowadze desorpcji (równanie 16).

W odniesieniu do każdej probówki badanej, zawartość substancji pozostającej zaadsorbowaną na glebie, w równowadze desorpcji, jest obliczana następująco:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ jest określone jako:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^{A}(\mu g) \quad (14)$$

gdzie:

$C_s^{des}(eq)$ = zawartość substancji badanej pozostającej zaadsorbowaną na glebie w równowadze desorpcji (μg g^{-1}),

$m_m^{des}(eq)$ = masa substancji określona analitycznie w fazie wodnej w równowadze desorpcji (μg),

▼B

m_{aq}^{A} = masa substancji badanej pozostałej z równowagi adsorpcji z powodu niepełnego podstawienia objętości (μg),

$m_{aq}^{des}(eq)$ = masa substancji w roztworze w równowadze adsorpcji (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = objętość roztworu pobrana z probówki do pomiaru substancji badanej, w równowadze desorpcji (cm^3),

V_r = objętość nadsączu usuniętego z probówki po uzyskaniu równowagi adsorpcji i zastąpieniu przez tę samą objętość roztworu 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3).

Równanie desorpcji Freundlicha znajduje się w (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

lub w postaci liniowej:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

gdzie:

K_F^{des} = współczynnik desorpcji Freundlicha,

n = stała regresji,

$C_{aq}^{des}(eq)$ = stężenie masowe substancji w fazie wodnej w równowadze desorpcji (μg cm^{-3}).

Równania 16 i 17 mogą być wykreślone, a wartości $K_F{}^{des}$ i l/n są obliczane za pomocą analizy regresyjnej, stosując równanie 17.

Uwaga:

Jeśli wykładnik l/n adsorpcji lub desorpcji Freundlicha jest równy 1, stałe wiążące adsorpcję lub desorpcję Freundlicha (K_F^{ads} i K_F^{des}), będą równe odpowiednio stałym równowagi adsorpcji lub desorpcji (K_d i K_{des}), a wykresy C_s vs C_{aq} będą liniowe. Jeśli wykładniki nie są równe 1, krzywe C_s vs C_{aq} będą nieliniowe, a stałe adsorpcji i desorpcji będą się zmieniać wzdłuż izoterm.

2.2.2. **Sprawozdanie z badania**

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

— Pełna identyfikacja użytych próbek gleby, włączając:

— geograficzne odniesienie miejsca (szerokość geograficzna, długość geograficzna),

— data pobierania próbek,

▼B

— użyty rodzaj (np. gleba rolnicza, leśna itd.),

— głębokość pobierania próbek,

— zawartość piasek/mul/glina,

— wartości pH (w 0,01 M $CaCl_2$),

— zawartość węgla organicznego,

— zawartość substancji organicznych,

— zawartość azotu,

— stosunek C/N,

— zdolność wymiany kationu (mmol/kg),

— wszystkie informacje odnoszące się do zbierania i przechowywania próbek,

— tam gdzie to jest stosowne, wszystkie istotne informacje dotyczące interpretacji adsorpcja/desorpcja substancji badanej,

— bibliografia dla metod zastosowanych dla oznaczenia każdego parametru,

— informacje dotyczące substancji badanej, jeśli to stosowne,

— temperatura doświadczeń,

— warunki odwirowania,

— procedura analityczna zastosowana do analizy substancji badanej,

— uzasadnienie w odniesieniu do każdego użycia środka ułatwiającego rozpuszczanie do przygotowania roztworu właściwego substancji badanej,

— wyjaśnienie korekt wykonanych w obliczeniach, jeśli to odpowiednie,

— dane zgodnie z formularzem (dodatek 6) wraz z prezentacją graficzną,

— wszystkie informacje i obserwacje pomocne dla interpretacji wyników badania.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(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) Franzle 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, OPPTS 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 (Koc) 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, pp. 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, pp. 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), pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 137–157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967), „Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric, 18, pp. 269–273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, pp. 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, pp. 961–971.

(25) Osgerby J. M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, pp. 247–258.

(26) Guth J. A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Boden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 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), pp. 135–172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C. S., (1971), „Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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 teachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 80–101,

(36) Lambert S. M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, pp. 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, pp. 667–668.

(38) Briggs G. G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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: pp. 222–234.

(43) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, pp. 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, pp. 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, pp. 49–143.

(46) Deli J., and Warren G. F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". Weed Sci. 19: pp. 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, pp. 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, p.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, pp. 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., pp. 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, pp. 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, pp. 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), pp. 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), pp. 227–231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments". J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 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), pp. 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.), pp.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, pp. 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, pp. 38–42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. Chemosphere, Vol. 10(8), pp. 833–846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilite-reactivite”. Revue de l'Agric, 34 (4), pp. 319–322.

(74) Muller M., Kórdel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil”. Chemosphere, 32(12), pp. 2493–2504.

(75) Kórdel 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), pp. 1373–1384.

(76) Kórdel 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), pp. 2341–2352.

(77) Hance, R. J., (1967), „The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides”. Weed Research, Vol. 7, pp. 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, pp.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, pp. 14–32.

(81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), „Studies in adsorption: XL 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, pp. 3973–93.

(82) Calvet R., Terce M., and Arvien J. C, (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caracteristiques generates de l'adsorption”. Ann. Agron. 31: pp. 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, UK.

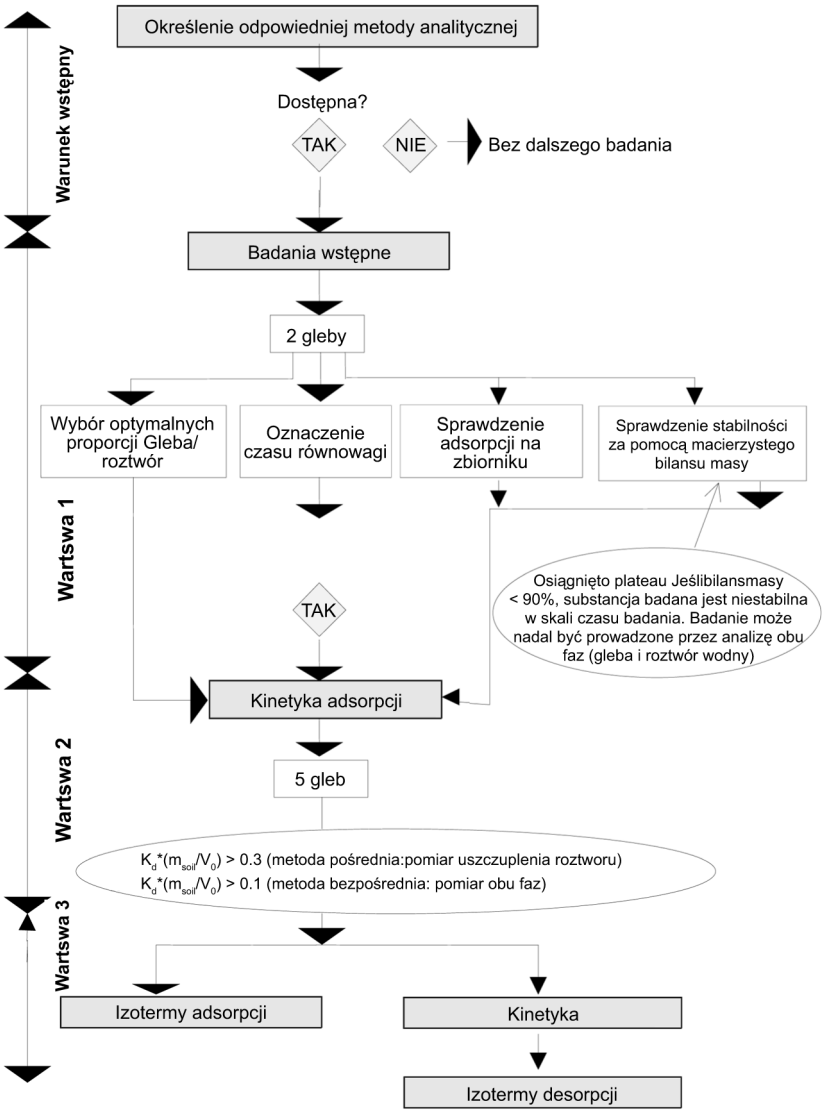
(84) Guth, J. A., (1985), „Adsorption/desorption”, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1–3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

DODATEK 1

Plan Badania



▼B

DODATEK 2

WPŁYW DOKŁADNOŚCI METODY ANALITYCZNEJ I ZMIAN STĘŻENIA NA DOKŁADNOŚĆ WYNIKÓW ADSORPCJI

Z następującej tabeli (84) jasno wynika, że kiedy różnica między masą początkową (m_o = 110 µg) a masą równowagi ($mm_{aq}^{ads}(eq)$ = 100 µg) substancji badanej w roztworze jest bardzo mała, błąd 5 % w pomiarze stężenia w równowadze powoduje błąd 50 % w obliczeniu masy substancji zaadsorbowanej w glebie (m $m_s^{ads}(eq)$) i 52,4 % w obliczeniu K_d.

Ilość gleby m_{soil} = 10 g

Objętość roztworu 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‡
	DLA A = 9 %							
m_0 = 110 µg or C_0=1,100 µg/cm^3	100	1,000	wartosc rzeczywista	10	1,00	wartosc rzeczywista	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 %
	DLA A = 55 %							
m_0= 110 µg or C_0=1,100µg/cm^3	50,0	0,500	wartosc rzeczywista	60,0	6,00	wartosc rzeczywista	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 %
	DLA A = 99 %							
m_0 = 110 µg or C_0=1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	wartosc rzeczywista	108,9	10,89	wartosc rzeczywista	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 %

gdzie:

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)]V_0}{m_{bodem}} \cdot Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{bodem}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = masa substancji badanej w fazie gleby w równowadze, µg,

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa substancji badanej w fazie gleby w równowadze, µg,

$C_s^{ads}(eq)$ = zawartość substancji badanej w fazie gleby w równowadze, µg g^{-1},

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = masowe stężenie substancji badanej w fazie wodnej w równowadze, µg cm^{-3}

R = błąd analityczny w oznaczaniu

R‡ = błąd obliczony spowodowany błędem analitycznym R.

▼B

DODATEK 3

TECHNIKI OSZACOWANIA DLA K_d

1. Techniki oszacowania pozwalają na przewidzenie K_d opartego na korelacjach z, na przykład wartością P_{ow} (12)(39)(63–68), danymi dotyczącymi wodnej rozpuszczalności (12)(19)(21)(39)(68–73) lub danych polarności wyprowadzonych z zastosowania HPLC w fazie odwróconej (74–76). Jak wskazano w tabelach 1 i 2, istnieją K_{oc} lub K_{om} obliczone tymi równaniami i następnie, pośrednio, K_d z równań:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1})$$

2. Pojecie tych korelacji jest oparte na dwóch założeniach: 1) jest to substancja organiczna gleby, która głównie wpływa na adsorpcje substancji; i 2) współdziałania wywołane są głównie substancjami niepolarnymi. Jako wynik te korelacje: 1) nie są, lub są tylko w pewnym zakresie, stosowane do substancji polarnych, i 2) nie są stosowane w przypadkach, gdy zawartość substancji organicznych w glebie jest bardzo mała (12). Dodatkowo, chociaż odkryto zadawalające korelacje między P_{ow} i adsorpcją (19), tego samego nie można powiedzieć o zależności między rozpuszczalnością w wodzie i zakresem adsorpcji (19)(21); tak więc badania są w istotnym stopniu sprzeczne.

3. Niektóre przykłady korelacji między współczynnikiem adsorpcji a współczynnikiem podziału oktanol-woda, jak również rozpuszczalność w wodzie, podano odpowiednio w tabelach 1 i 2.

Tabela 1

Przykłady korelacji między współczynnikiem podziału adsorpcji a współczynnikiem podziału oktanol-woda; dalsze przykłady w (12)(68)

Substancja	Korelacje	Autorzy
Podstawione moczniki	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromatyczne chlorowane	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Różne pestycydy	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl i Mingelgrin (1984) (66)
Aromatyczne węglowodory	$\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles i Mantoura (1987) (67)

Tabela 2

Przykłady korelacji między współczynnikiem podziału adsorpcji i rozpuszczalnością w wodzie; dalsze przykłady zob. (68)(69)

Związki	Korelacje	Autorzy
Różne pestycydy	$\text{Log } K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl i Mingelgrin (1984) (66)
Alifatyczne, aromatyczne substancje chlorowane	$\log K_{om} = (4{,}040 \text{ +/- } 0{,}038) - (0{,}557 \text{ +/- } 0{,}012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
α-naftol	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Cykliczne, alifatyczne aromatyczne	$\log K_{oc} = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981)(72)
Różne związki	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

DODATEK 4

OBLICZENIA W ODNIESIENIU DO OKREŚLNIA WARUNKÓW WIROWANIA

1. Czas odwirowania jest podany za pomocą następującego wzoru, włączając sferyczne cząstki:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] tn(R_b/R_t) \qquad (1)$$

Do celów uproszczenia, wszystkie parametry są opisane w jednostkach nie-SI (g, cm).

gdzie:

ω = szybkość obrotowa (=2 *n* rpm/60), rad s^{-1},

rpm = broty na minutę,

η = lepkość roztworu, g s^{-1} cm^{-1},

r_p = promień cząstki, cm,

ρ_s = gęstość gleby, g cm^{-3},

ρ_{aq} = gęstość roztworu, g cm^{-3},

R_t = odległość od środka wirnika wirówki do górnego poziomu roztworu w probówce wirówki, cm,

R_b = odległość od środka wirnika wirówki do dna probówki, cm

R_b-R_t = długość mieszaniny gleba/roztwór w probówce wirówki, cm.

W ogólnej praktyce stosuje się podwojony obliczony czas w celu zapewnienia całkowitego oddzielenia.

2. Równanie (1) może być uproszczone dalej, jeśli założymy, że lepkość (η) i gęstość (ρ_{aq}) roztworu jest równa lepkości i gęstości wody w 25 °C; zatem, η = 8,95 x 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} i ρ_{aq} = 1,0 g, cm^{-3}.

Zatem, czas wirowania jest podany za pomocą równania (2)

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 . r_p^2(\rho_s - 1)} \ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Z równania 2 jasno wynika, że dwa parametry są ważne dla określania warunków wirowania, tj. czas (t) szybkość (rpm), w celu uzyskania rozdzielenia cząstek o szczególnym wymiarze (w tym przypadku promień 0,1 μm): 1) gęstość gleby; oraz 2) długość mieszaniny w probówce wirówki (R_b-R_t), tj. odległość, którą przebywa cząstka z góry roztworu do dna probówki, oczywiście dla ustalonej objętości długość mieszaniny w probówce zależy od kwadratu promienia probówki.

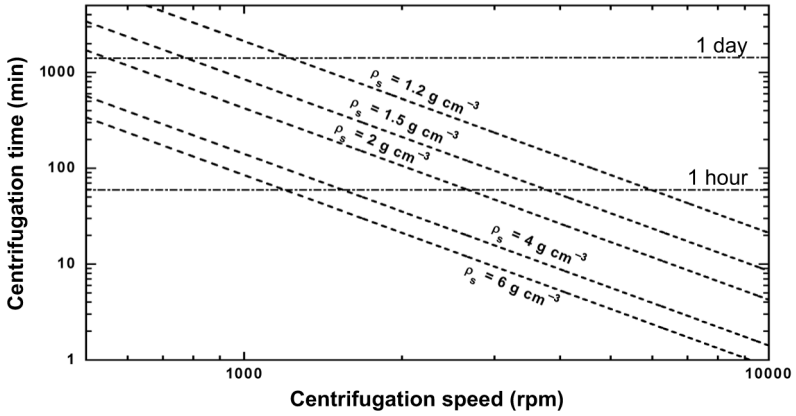
4. Rysunek 1 przedstawia zmiany w czasie wirowania (t) w zależności od szybkości wirowania (rpm) dla różnych gęstości gleby (ρ_s) (rys. la) i różnych długości mieszaniny w probówkach wirówki (rys. 2a). Z rys. la wpływ gęstości gleby wynika w sposób oczywisty, na przykład dla klasycznego wirowania przy 3000 rpm czas wirowania wynosi w przybliżeniu 240 min dla gęstości gleby 1,2 g cm^3, podczas gdy jest to tylko 50 min. dla 2,0 g cm^3. Podobnie, z rys. lb, dla klasycznego wirowania 3000 rpm czas wirowania wynosi w przybliżeniu 50 min dla długości mieszaniny 10 cm i tylko 7 min. dla długości 1 cm. Jednakże istotne jest odkrycie optymalnej zależności między wirowaniem które wymaga możliwie mniejszej długości i ułatwionego postępowania eksperymentatora w rozdzielaniu faz po odwirowaniu.

▼B

5. Ponadto przy określaniu doświadczalnych warunków rozdzielania faz gleba/roztwór, istotne jest rozważenie możliwości istnienia trzeciej „pseudofazy", koloidów. Cząstki te, o wielkości mniejszej niż 0,2 (μm, mają ważny wpływ na cały mechanizm adsorpcji substancji w zawiesinie gleby. Gdy wirowanie jest wykonywane jak opisano powyżej, koloidy pozostają w fazie wodnej i podlegają analizie wraz z wodną fazą. W ten sposób informacja o ich wpływie jest tracona.

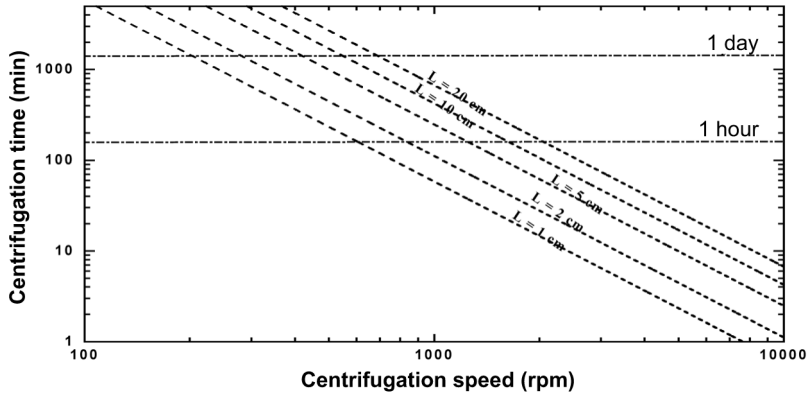
   Jeśli laboratorium prowadzące badanie posiada urządzenia ultrawirujące lub ultrafiltrujące, adsorpcja/desorpcja substancji w glebie może być badana dogłębiej, włączając informacje o adsorpcji substancji na koloidach. W tym przypadku należy zastosować ultrawirowanie przy 60 000 rpm/min lub ultrafiltrację z filtrem o porowatości 100 000 daltonów w celu rozdzielenia trzech faz gleby, koloidów i roztworu. Protokół badania powinien być również odpowiednio zmodyfikowany w celu objęcia wszystkich trzech faz analizą substancji.

Rys. 1a.



Zmiany czasu wirowania (t) w zależności od szybkości wirowania (rpm) w odniesieniu do różnych gęstości gleb (p_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} przy 25 °C.

Rys. 1b.



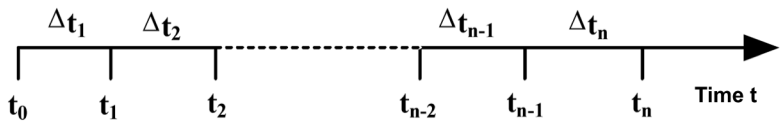
Zmiany czasu wirowania (t) w zależności od szybkości wirowania (rpm) w odniesieniu do różnych długości mieszaniny w probówce wirówki (R_b-R_t) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} przy 25 °C i ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

DODATEK 5

OBLICZANIE ADSORPCJI A (%) I DESORPCJI D (%)

Schemat czasowy procedury jest następujący:



W odniesieniu do wszystkich obliczeń zakłada się, że substancja badana jest stabilna i nie adsorbuje się w sposób znaczący na ściankach naczynia.

ADSORPCJA A (A%)

a) *Metoda równoległa*

Procent adsorpcji jest obliczany w odniesieniu do każdej probówki badanej (i) w każdym punkcie czasu (t_i), zgodnie z równaniem:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)\ (^1)$$

Człony niniejszego równania są obliczane następująco:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

gdzie:

A_{ti} = procent adsorpcji (%) w punkcie czasu t_i,

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa substancji badanej na glebie, w czasie t_i w którym wykonywana jest analiza (µg),

m_0 = masa substancji badanej w probówce badanej, przy rozpoczęciu badania (µg),

C_0 = stężenie masowe początkowe roztworu badanego w kontakcie z glebą (µg cm^{-3}),

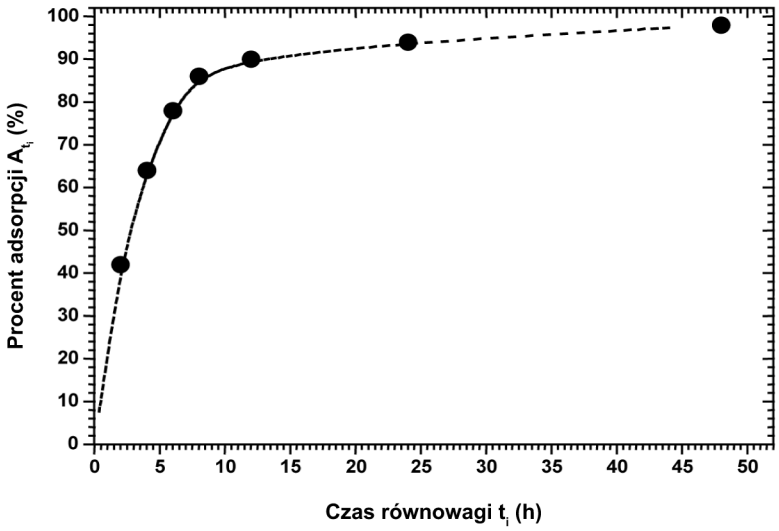
(1) Równanie ma zastosowanie do obu metod, bezpośredniej i pośredniej. Wszystkie inne równania stosowane są tylko dla metody pośredniej.

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = stężenie masowe substancji w fazie wodnej w czasie t_i w którym prowadzona jest analiza (µg cm^{-3}); niniejsze stężenie jest ustalone analitycznie, uwzględniając wielkości określone ślepą próbą.

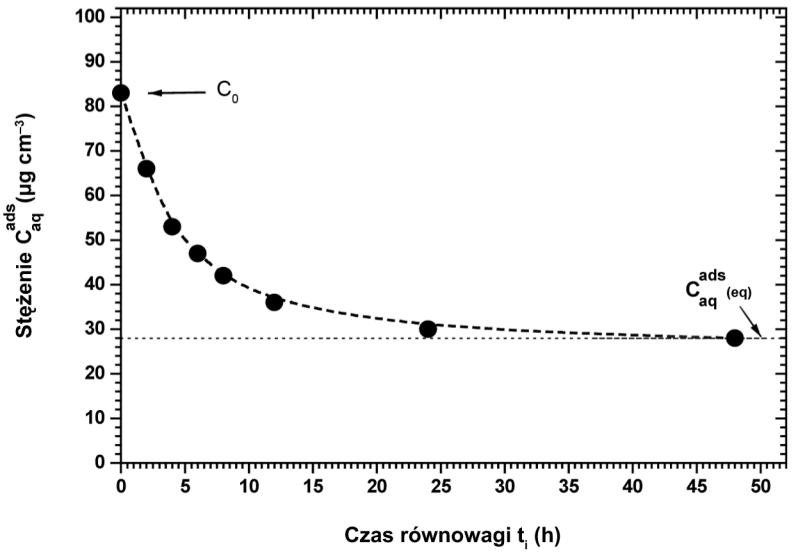
V_0 = początkowa objętość roztworu badanego w kontakcie z glebą (cm^3).

Wartości procentu adsorpcji A_{t_i} lub $C_{aq}^{ads}(t_i)$ są wykreślane w zależności od czasu i czasu, po którym osiągana jest równowaga sorpcji. Przykłady takich wykresów podano odpowiednio na rys. 1 i rys.2.



Rys. 1.

Krzywa równowagi adsorpcji



Rys.2

Stężenie masowe substancji badanej w fazie wodnej (C_{aq}) w zależności od czasu

▼B

b) *Metoda szeregowa*

Następujące równania są uwzględniane, jeśli zastosowano procedurę adsorpcji, przez oznaczenie substancji badanej w małych podwielokrotnościach fazy wodnej przy właściwych przedziałach czasu.

— W ramach każdego przedziału czasu ilość substancji zaadsorbowanej na glebie jest obliczana w następujący sposób:

— dla pierwszego przedziału czasu $\Delta t_1 = t_1\text{-}t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— dla drugiego przedziału czasu $\Delta t_2 = t_2\text{-}t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— dla trzeciego przedziału czasu Δt3 = t3-t2

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— dla n-tego przedziału czasu Atn = tn-tn-1

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Procent adsorpcji w każdym przedziale czasowym, $A_{\Delta t_i}$, jest obliczany przez zastosowanie następującego równania:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

gdzie procent adsorpcji A_{t_i} w punkcie czasu t_i jest podany za pomocą równania:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Wartości adsorpcji A_{t_i} lub $A_{\Delta t_i}$ (w odniesieniu do potrzeb badania) są wykreślane w zależności od czasu i czasu po którym uzyskana równowaga sorpcji jest stała.

— Przy czasie równowagi t_{eq}:

— masa substancji badanej zaadsorbowana na glebie wynosi:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— masa substancji badanej w roztworze wynosi:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— i procent adsorpcji w równowadze wynosi:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Parametry użyte powyżej są określone jako:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = masa substancji zaadsorbowana na glebie w ciągu przedziałów czasu, odpowiednio Δt_1, Δt_2,..., Δt_n (μg),

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = masa substancji zmierzona w podwielokrotności v_a^A, odpowiednio w punktach czasu t_1, t_2, …, t_n (μg),

$m_s^{ads}(eq)$ = masa substancji zaadsorbowanej na glebie przy równowadze adsorpcji (μg),

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa substancji w roztworze przy równowadze adsorpcji (μg),

v_a^A = objętość podwielokrotności w której substancja badana jest mierzona (cm

$A_{\Delta ti}$ = procent adsorpcji odpowiadający przedziałowi czasowemu Δt_i (%),

A_{eq} = procent adsorpcji przy równowadze adsorpcji (%).

DESORPCJA D (A%)

Czas t_0 rozpoczęcia doświadczenia kinetyki desorpcji, jest określany jako moment, w którym maksymalna odzyskana objętość roztworu badanej substancji (po osiągnięciu równowagi adsorpcji) jest podstawiana równą objętością roztworu 0,01 M $CaCl_2$.

a) *Metoda równoległa*

W punkcie czasu t_i, masa substancji badanej jest mierzona w fazie wodnej pobranej z probówki i (V_r^i) masa zdesorbowana jest obliczana według równania:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Przy równowadze desorpcji $t_i = t_{eq}$ i zatem $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

Masa substancji badanej zdesorbowanej podczas przedziału czasowego (Δt_i) jest podana za pomocą równania:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Procent desorpcji jest obliczany:

w punkcie czasu t_i z równania:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (15)$$

i podczas przedziału czasowego (Δt_i) z równania:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (16)$$

gdzie:

D_{ti} = procent desorpcji w punkcie czasu t_i (%),

$D_{\Delta ti}$ = procent desorpcji odpowiadający przedziałowi czasu Δt_i (%),

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = masa substancji zdesorbowanej w punkcie czasu t_i (μg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = masa zaadsorbowanej substancji badanej w ciągu przedziału czasu Δt_i (μg),

$m_m^{des}(t_i)$ = masa substancji badanej zmierzona analitycznie w czasie t_i w objętości roztworu V_r^ipobranej do analizy (μg),

$m_{aq}{}^{A}$ = masa substancji badanej pozostającej z równowagi adsorpcji wymaganej do niepełnego podstawienia objętości (μg),

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \qquad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa substancji badanej w roztworze w równowadze adsorpcji (μg),

V_R = objętość nadsączu zlanego z probówki po osiągnięciu równowagi adsorpcji i zastąpieniu tą samą ilością roztworu 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3),

V_r^i = objętość roztworu pobranego z probówki (i) do pomiaru substancji badanej w doświadczeniu kinetyki desorpcji (cm^3).

Wielkości desorpcji D_{ti} lub $D_{\Delta t_i}$ (zgodnie z potrzebami badań) są wykreślane w zależności od czasu i czasu po którym uzyskana równowaga desorpcji jest stała.

b) *Metoda szeregowa*

Następujące równania są uwzględniane, jeśli zastosowano procedurę adsorpcji, przez oznaczenie substancji badanej w małych podwielokrotnościach (v_a^A) fazy wodnej (metoda szeregowa w 1.9. Wykonanie badania). Zakłada ona, że: a) objętość nadsączu zlanego z probówki po doświadczeniu kinetyki adsorpcji, była zastąpiona tą samą objętością roztworu 0,01 M CaCl2 (V_R); i b) całkowita objętość fazy wodnej w kontakcie z glebą (V_T) w czasie trwania doświadczenia pozostaje stała oraz jest podana za pomocą równania:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \qquad (18)$$

▼B

W punkcie czasu t_i:

— masa substancji badanej jest mierzona w małej podwielokrotności (v_a^D), a masa desorbowana jest obliczana według równania:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— w równowadze desorpcji $t_i = t_{eq}$, a zatem $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$,

— procent desorpcji D_{t_i} obliczany jest według równania:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

W przedziale czasowym (Δt_i):

W trakcie każdego przedziału czasu ilość substancji desorbowanej jest obliczana następująco:

— dla pierwszego przedziału czasu $\Delta t_1 = t_1\text{-}t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \quad \text{και} \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— dla drugiego przedziału czasu $\Delta t_2 = t_2\text{-}t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (22)$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

(22) — dla n-tego przedziału czasu $\Delta t_n = t_n\text{-}t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \quad (23)$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Ostatecznie procent desorpcji w każdym przedziale czasowym, $D_{\Delta t_i}$, jest wyliczany, stosując następujące równanie:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

gdzie procent desorpcji D_{t_i} w punkcie czasu t_i jest podany za pomocą równania:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

Gdzie powyższe użyte parametry są określone jako:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = masa substancji zaadsorbowanej na glebie po przedziałach czasowych Δt_1, Δt_2,..., Δt_n odpowiednio (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = masa substancji badanej zdesorbowanej podczas przedziałów czasowych Δt_1, Δt_2,..., Δt_n odpowiednio (μg);

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = masa substancji zmierzona w podwielokrotności (v_a^D) w punktach czasu t_1,t_2,..., t_n, odpowiednio (μg);

V_T = całkowita objętość fazy wodnej w kontakcie z glebą, podczas trwania doświadczenia kinetycznej desorpcji, przeprowadzonego metodą szeregową (cm^3),

m^A_{aq} = masa substancji badanej pozostałej z równowagi adsorpcji wymagana do niepełnego podstawienia objętości (μg),

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = objętość nadsączu usuniętego z probówki po uzyskaniu równowagi adsorpcji i zastąpiona tą samą objętością roztworu 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3),

v_a^D = objętość podwielokrotności pobranej do celów analitycznych z probówki (i), w czasie trwania doświadczenia kinetyki desorpcji, wykonywanej metodą seryjną (cm^3),

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

DODATEK 6

ADSORPCJA-DESORPCJA W GLEBACH: ARKUSZ PRZEDSTAWIANIA DANYCH

Badana substancja:

Badana gleba:

Zawartość suchej masy W glebie (105 °C, 12 godz.): ..... %

Temperatura: ..... °C

Odpowiedniość metody analitycznej

Zważona gleba	g	
Gleba: sucha masa	8	
Objętość roztworu $CaCl_2$	cm^3	
Nominalne stężenie roztworu końcowego	$\mu g\ cm^{-3}$	
Analityczne stężenie roztworu końcowego	$\mu g\ cm^{-3}$	

Zasada zastosowanej metody analitycznej:

Kalibracja metody analitycznej:

Badana substancja:

Badana gleba:

Zawartość suchej masy w glebie (105 °C, 12 godz.): ..... %

Temperatura: ..... °C

Zastosowana analityczna metodologia: Pośrednia ☐ Równoległa ☐ Szeregowa ☐

Bezpośrednia ☐

Badanie adsorpcji: próbki badane

	Symbol	Jednostki	Czas równoważenia		Czas równoważenia		Czas równoważenia		Czas równoważenia	
Probówka nr										
Zważona gleba	—	g								
Gleba: sucha masa	m_{soil}	g								
Objętość wody w zważonej glebie (obliczona)	v_{ws}	cm^3								
Objętość 0,01 M $CaCl_2$ roztworu do zrównoważenia gleby		cm^3								
Objętość roztworu podstawowego		cm^3								
Całkowita objętość fazy wodnej w kontakcie z glebą	V_o	cm^3								
Początkowe stężenie badanego roztworu	C_o	$\mu g\ cm^{-3}$								
Masa substancji badanej na początku badania	m_0	µg								

▼B

	Symbol	Jednostki	Czas równoważenia		Czas równoważenia		Czas równoważenia		Czas równoważenia	
Po mieszaniu i odwirowaniu										
METODA POŚREDNIA										
Metoda równoległa										
Stężenie w wodnej fazie badanej substancji, włączając ślepą próbę	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Metoda szeregowa										
Podwielokrotna masa zmierzona substancji badanej	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
METODA BEZPOŚREDNIA										
Masa badanej substancji zaadsorbowanej na glebie	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Obliczenie adsorpcji										
Adsorpcja	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Środek										
Współczynnik adsorpcji	K_d	cm^3 g^{-1}								
Środek										
Współczynnik adsorpcji	K_{oc}	cm^3 g^{-1}								
Środek										

Badana substancja:

Badana gleba:

Zawartość suchej masy w glebie (105 °C, 12 godz.): ..... %

Temperatura: ..... °C

Badanie adsorpcji: próby ślepe i kontrolne

	Symbol	Jednostki	Ślepa		Ślepa		Kontrolna	
Probówka nr								
Zważona gleba		g					0	0
Ilość wody w zważonej glebie(obliczona)		cm^3					—	—
Dodana objętość roztworu 0,01 M $CaCl_2$		cm^3						
Dodana objętość roztworu podstawowego substancji badanej		cm^3	0	0				
Całkowita objętość fazy wodnej (obliczona)		cm^3					—	—

▼B

	Symbol	Jednostki	Ślepa		Ślepa		Kontrolna	
Początkowe stężenie substancji badanej w fazie wodnej		μg cm^{-3}						
Po mieszaniu i odwirowaniu								
Stężenie w fazie wodnej		μg cm^{3}						

Uwaga: jeśli konieczne, dodać kolumny.

Badan substancja:

Badana gleba:

Zawartość suchej masy w glebie (105 °C, 12 godz.): ..... %

Temperatura: ..... °C

Bilans masy

	Symbol	Jednostki				
Probówka nr						
Zważona gleba	—	g				
Gleba: sucha masa	m_{soil}	g				
Objętość wody w zważonej glebie (obliczona)	V_{WS}	ml				
Objętość roztworu 0,01 M $CaCl_2$ do równoważenia gleby		ml				
Objętość roztworu podstawowego		cm^3				
Całkowita objętość fazy wodnej w kontakcie z glebą	V_0	cm^3				
Początkowe stężenie roztworu badanego	C_o	μg cm^{-3}				
Czas równoważenia	—	h				
Po mieszaniu i odwirowaniu						
Stężenie wodnej fazy substancji badanej w równowadze adsorpcji, włączono korektę na ślepą próbę	$C_{aq}^{ads}(eq)$	μg cm^{-3}				
Czas równoważenia	t_{eq}	h				
Pierwsze rozcieńczenie rozpuszczalnikiem						
Usunięta objętość fazy wodnej	V_{rec}	cm^3				
Dodana objętość rozpuszczalnika	ΔV	cm^3				
Pierwszasza ekstrakcja rozpuszczalnikiem						
Analizowany sygnał w rozpuszczalniku	S_{E1}	var.				
Stężenie substancji badanej w rozpuszczalniku	C_{E1}	μg cm^{-3}				

▼B

	Symbol	Jednostki				
Masa substancji wyekstrahowanej z gleby i ścianek zbiornika	M_{E1}	µg				
Drugie rozcieńczenie rozpuszczalnikiem						
Usunięta objętość rozpuszczalnika	ΔV_S	cm^3				
Dodana objętość rozpuszczalnika	ΔV	cm^3				
Druga ekstrakcja rozpuszczalnikiem						
Analizowany sygnałw fazie rozpuszczalnika	S_{E2}	var.				
Stężenie substancji badanej w rozpuszczalniku	CE2	µg cm^{-3}				
Masa substancji wyekstrahowanej z gleby i ścianek zbiornika	m_{E2}	µg				
Całkowita masa substancji badanej wyekstrahowanej w dwóch kolejnych krokach	m_E	µg				
Bilans masy	MB	%				

Badana substancja:

Badana gleba:

Zawartość suchej masy w glebie (105 °C, 12 godz.): ..... %

Temperatura:.....°C

Izotermy adsorpcji

	Symbol	Jednostki								
Probówka nr										
Zważona gleba	—	g								
Gleba:sucha masa	E	g								
Objętość wody w zważonej glebie (obliczona)	V_{WS}	cm^3								
Objętość roztworu 0,01 M $CaCl_2$ do zrównoważenia gleby		cm^3								
Objętość dodanego roztworu podstawowego		cm^3								
Całkowita objętość fazy wodnej w kontakcie z glebą (obliczona)	V_0	cm^3								
Stężenie roztworu	C_0	µg cm^{-3}								
Czas równoważenia	—	h								

▼B

	Symbol	Jednostki								
Po mieszaniu i odwirowaniu										
Stężenie substancji w fazie wodnej, włączono poprawkę na ślepą próbę	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatura		°C								
Masa adsorpcji na jednostkę gleby	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Analiza regresyjna:

wartość K_F^{ads}:

wartość 1/n:

Współczynnik regresji r^2:

Badana substancja:

Badana gleba:

Zawartość suchej masy w glebie (105 °C, 12 godz.): ..... %

Temperatura: ..... °C

Zastosowana analityczna Pośrednia ☐ Szeregowa ☐ Metodologia: ☐ Równoległa

Badanie desorpcji

		Symbol	Jednostki	Przedział czasu	Przedział czasu	Przedział czasu	Przedział czasu
Probówka nr pochodząca z kroku adsorpcji							
Masa substancji zaadsorbowanej na glebie w równowadze adsorpcji		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Usunięta objętość fazy wodnej, zastąpiona przez 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Całkowita objętość fazy wodnej w kontakcie z glebą	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Masa substancji badanej pozostająca w równowadze adsorpcji wymagana do niepełnego podstawienia objętości		m_{aq}^A	µg				
Kinetyka desorpcji							
Zmierzona masa substancji zdesorbowanej z gleby w czasie t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Objętość roztworu pobranego z probówki (i) do pomiaru substancji badanej	PM	v_r^i	cm^3				
	SM	v_a^D	cm^3				
Masa substancji zdesorbowana z gleby w czasie t_i (obliczona)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Masa substancji zdesorbowana z gleby w czasie trwania przedziału czasowego Δt_i (obliczona)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Symbol	Jedno-stki	Przedział czasu	Przedział czasu	Przedział czasu	Przedział czasu
Procent desorpcji						
Desorpcja w czasie t_i	D_{t_i}	%				
Desorpcja w przedziale czasowym $D_{\Delta ti}$	$D_{\Delta t_i}$	%				
Pozorny współczynnik desorpcji	K_{des}					

PM: metoda równoległa

SM: metoda szeregowa

▼B

C.19. **OSZACOWANIE WSPÓŁCZYNNIKA ADSORPCJI (K_{OC}) NA GLEBIE I W OSADZIE ŚCIEKOWYM PRZY ZASTOSOWANIU WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC)**

1. **METODA**

Niniejsza metoda jest kopią OECD TG121 (2000).

1.1. WPROWADZENIE

Zachowanie się sorpcji substancji w glebach lub osadach ściekowych może być opisane za pomocą parametrów określonych doświadczalnie w rozumieniu metody badania C.18. Ważnym parametrem jest współczynnik adsorpcji, który określa się jako stosunek między stężeniem substancji w gleba/osad ściekowy a stężeniem substancji w fazie wodnej w równowadze adsorpcji. Współczynnik adsorpcji znormalizowany do zawartości węgla organicznego gleby K_{oc} jest użytecznym wskaźnikiem zdolności wiązania substancji chemicznych na ciałach organicznych gleby i osadu ściekowego oraz pozwalającym na dokonanie porównań między różnymi substancjami chemicznymi. Niniejszy parametr może być oszacowany poprzez korelacje rozpuszczalności wodnej i współczynnikiem podziału n-oktanol/woda (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Metoda doświadczalna opisana w niniejszym badaniu, używa HPLC dla oszacowania współczynnika adsorpcji K_{oc} w glebie i w osadzie ściekowym (8). Oceny są wyższej wiarygodności niż te z obliczeń QSAR (9). Jako metoda oszacowania nie może w pełni zastąpić doświadczeń okresowej równowagi, zastosowanej w metodzie badanej C18. Jednakże oszacowany K_{oc} jest użyteczny dla wyboru właściwych parametrów badania dla badań adsorpcja/desorpcja zgodnie z metodą badania C.18, poprzez wyliczenie K_d (współczynnik podziału) lub K_f (współczynnik adsorpcji Freundlicha) zgodnie z równaniem 3 (zob. pkt 1.2).

1.2. DEFINICJE

K_d: Współczynnik podziału jest zdefiniowany jako stosunek stężenia równowagi C roztworu substancji badanej w systemie dwufazowym składającym się z sorbentu (gleba lub osad ściekowy) i fazy wodnej; jest to wartość bezwymiarowa, natomiast stężenia w obu fazach są wyrażone na podstawie waga/waga. W przypadku stężenia w fazie wodnej podano je na bazie waga/objętość, zatem jednostką jest ml· g^{-1}. K_d zmienia się z właściwościami sorbentu i może być zależny od stężenia.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \; or \; \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

gdzie:

C_{soil} = stężenie substancji badanej w glebie w równowadze (µg· g^{-1}),

C_{sludge} = stężenie substancji badanej w osadzie w równowadze (µg· g^{-1}),

C_{aq} = stężenie substancji badanej w fazie wodnej w równowadze (µg· g^{-1}, µg ml^{-1}).

▼B

K_f: Współczynnik adsorpcji Freundlicha definiuje się jako stężenie substancji badanej w glebie lub osadzie ściekowym (x/m), gdy stężenie równowagi C_{aq} w fazie wodnej jest równe jeden; jednostką jest μg· g^{-1} sorbenta. Wartość zmienia się z właściwościami sorbenta.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

gdzie:

x/m = ilość substancji badanej x (μg) zaadsorbowanej na ilości sorbenta m (g) w równowadze

1/n = nachylenie izotermy adsorpcji Freundlicha

C_{aq} = stężenie substancji badanej w fazie wodnej w równowadze (μg . ml^{-1})

$$\text{At} C_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: Współczynnik podziału (K_d) lub współczynnik adsorpcji Freundlicha (K_f) znormalizowany do zawartości węgla organicznego (f_{oc}) sorbenta; w szczególności dla niezjonizowanych substancji chemicznych, jest to przybliżony wskaźnik dla zasięgu adsorpcji między substancją a sorbentem, pozwalający na dokonanie porównań między różnymi substancjami chemicznymi. W zależności od wymiarów K_d i K_f, K_{oc} są bezwymiarowe lub mają jednostki ml . g^{-1} lub μg . g^{-1} ciała organicznego.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \left(\text{bezwymiarowe lub ml} \cdot g^{-1}\right) \text{lub} \frac{K_f}{f_{oc}} \left(\mu g \cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

Zależność między K_{oc} i K_d nie zawsze jest liniowa i w ten sposób wartości K_{oc} mogą różnić się od gleby do gleby, ale ich różnorodność jest znacznie zmniejszona porównując do wartości K_d lub K_f.

Współczynnik adsorpcji (K_{oc}) jest wyprowadzony ze współczynnika zdolności (k") przy użyciu krzywej kalibracji, wykreślając log k' w zależności od log K_{oc} wybranych związków odniesienia.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

gdzie:

t_R = HPLC czas retencji substancji badanej i substancji odniesienia (minuty)

t_0 = HPLC czas martwy (minuty) (zob. pkt 1.8.2).

P_{ow}: współczynnik podziału oktanol-woda jest określony jako stosunek stężenia roztworu substancji w n-oktanolu i wody; jest bezwymiarową wartością.

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Wzór strukturalny, czystość, stała dysocjacji (jeśli to właściwe) powinny być znane przed zastosowaniem metody. Informacje dotyczące rozpuszczalności w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych, współczynniku podziału oktanol-woda oraz cechy hydrolizy są przydatne.

▼B

Aby skorelować zmierzone przez HPLC dane retencji substancji badanej i jej współczynnik adsorpcji K_{oc}, ustalana jest krzywa kalibracji log K_{oc} w zależności od log k'. Powinno być zastosowane minimum sześć punktów odniesienia, co najmniej jeden powyżej i jeden poniżej wartości oczekiwanej substancji badanej. Dokładność metody będzie znacząco poprawiona, jeśli substancje wzorcowe są strukturalnie związane z zastosowaną substancją badaną. Jeśli takie dane nie są dostępne, jest zadaniem użytkownika wybranie właściwych substancji wzorcowych. W tym przypadku powinien zostać wybrany bardziej ogólny zestaw strukturalnie heterogenicznych substancji. Substancje stosowane i wartości K_{oc} są wymienione w dodatku w tabeli 1 dotyczącej osadów ściekowych i w tabeli 3 dotyczącej gleb. Wybór innych substancji kalibracyjnych powinien być uzasadniony.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

HPLC wykonuje się na analitycznych kolumnach napełnionych handlowo dostępnym cyjanopropylem w fazie stałej zawierającej lipofilowe i polarne grupy cząsteczkowe. Umiarkowanie stacjonarna faza polarna jest oparta na stosowanej matrycy krzemionkowej:

-O-Si	— CH_2 — CH_2 — CH_2	-CN
krzemionka	niepolarna połowa (odstęp)	polarna połowa

Zasada metody badania jest podobna do metody badania A.8 (współczynnik podziału, HPLC metoda). Podczas przejścia przez kolumnę wraz z ruchomą fazą, substancja badana oddziałuje z fazą stacjonarną. W wyniku rozdzielenia między fazami ruchomą i stacjonarną badana substancja jest opóźniona. Podwójny skład fazy stacjonarnej posiadającej polarne i niepolarne powierzchnie pozwala na współdziałanie polarnych i niepolarnych grup cząsteczki w podobny sposób jak dla matryc ciał organicznych w glebie lub osadu ściekowego. Umożliwia to zależności między czasem retencji na kolumnie i współczynnikiem adsorpcji na powstających substancjach organicznych.

Wartość pH ma znaczący wpływ na zachowania sorpcyjne, w szczególności w odniesieniu do substancji polarnych. W odniesieniu do gleb rolniczych lub zbiorników oczyszczalni ścieków pH zwykle zmienia się między 5,5 a 7,5. Dla podatnych na jonizację substancji należy wykonać dwa badania zarówno z formą jonową, jak i niejonową we właściwych roztworach buforowych, ale tylko w przypadkach, gdy co najmniej 10 % związku badanego jest zdysocjowana w zakresie pH 5,5–7,5.

Ponieważ tylko zależność między retencją na kolumnie HPLC a współczynnikiem adsorpcji jest wykorzystywana do oceny, nie jest wymagana analityczna metoda ilościowa i konieczne jest określenie tylko czasu retencji. Jeśli dostępny jest odpowiedni zestaw substancji odniesienia i stosowane mogą być standardowe warunki doświadczalne, metoda stanowi szybki i skuteczny sposób oszacowania współczynnika adsorpcji K_{oc}.

1.5. MOŻLIWOŚĆ ZASTOSOWANIA BADANIA

Metoda HPLC ma zastosowanie do substancji chemicznych (nieetykietowanych lub etykietowanych) w odniesieniu do których jest dostępny właściwy system detakcji (np. spektrofotometer, detektor radioaktywności) i które są wystarczająco stabilne podczas czasu trwania doświadczenia. Może to być szczególnie użyteczne w odniesieniu do substancji chemicznych które są trudne do badań w innych systemach doświadczalnych (tj. substancje lotne, substancje nierozpuszczalne w wodzie w stężeniu które może być analitycznie zmierzone, substancje z wysokim powinowactwem do powierzchni systemów inkubacyjnych). Metoda jest użyteczna w odniesieniu do mieszanin dających pasma nierozuszczalnej elucji. W takim przypadku górne i dolne granice wartości log K_{oc} związków mieszaniny badanej powinny być określone.

▼B

Zanieczyszczenia mogą czasem powodować problemy dotyczące interpretacji wyników z HPLC, lecz mają małe znaczenie w zakresie w jakim substancja badana może analitycznie być wyraźnie określona oraz oddzielana od zanieczyszczeń.

Metoda jest uzasadniona w odniesieniu do substancji wymienionych w tabeli 1 w dodatku oraz była również stosowana do różnych innych substancji chemicznych należących do następujących chemicznych klas:

— aminy aromatyczne (np. trifluralin, 4-chloroanilina, 3,5-dinitroanilina, 4-metyloanilina, N-metyloanilina, 1-naftyloamina),

— estry aromatycznych kwasów karboksylowych (np. metyloester kwasu benzoesowego, ester etylowy kwasu 3,5-dinitrobenzoesowego),

— węglowodory aromatyczne (np. toluen, ksylen, etylobenzen, nitrobenzen),

— estry kwasu aryloksyfenoksypropioniowego (np.diclofop-metylowy, fenoxaprop-etylowy, fenoxaprop-P-etylowy),

— środki grzybobójcze benzimidazolu i imidazolu (np. carbendazim, fuberidazol, triazoxid),

— amidy kwasu karboksylowego (np. 2-chlorobenzamid, N,N-dimetylobenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-metylobenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid),

— chlorowane węglowodory (np. endosulfan, DDT, heksachlorobenzen, quintozen, 1,2,3-trichlorobenzen),

— fosforoorganiczne środki owadobójcze (np. azinphos-metylowy, disulfoton, fenamiphos, isofenphos, pyrazophos, sulprofos, triazophos),

— fenole (np. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentachlorofenol, 2,4,6-trichlorofenol, 1-naftol),

— pochodne fenylomocznika (np. isoproturon, monolinuron, pencycuron),

— pigmentowe barwniki (np. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),

— węglowodory poliaromatyczne (np. acetonaften, naftalen),

— środki chwastobójcze 1,3,5-triazyny (np. prometryn, propazine, simazine, terbutryn),

— pochodne triazolu (np. tebuconazole, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Metody nie stosuje się do substancji, które reagują z eluentem albo z fazą stacjonarną. Nie jest także stosowana do substancji, które oddziaływają w szczególny sposób ze składnikami nieorganicznymi (np. tworzenie grup kompleksów z minerałami gliny). Metoda nie działa z substancjami powierzchniowo czynnymi, związkami nieorganicznymi i umiarkowanymi lub mocnymi organicznymi kwasami i zasadami. Wartości log K_{oc} w zakresie 1,5–5,0 mogą być określone. Podatne na jonizację substancje muszą być mierzone, stosując buforowaną fazę ruchomą, należy jednak zachować ostrożność, aby zapobiec strącaniu się składników buforu lub substancji badanej.

▼B

1.6. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

1.6.1. **Dokładność**

Zwykle współczynnik adsorpcji substancji badanej może być szacowany w zakresie ± 0,5 log jednostki wartości określonej przez okresową metodę równowagi (zob. tabela 1 w dodatku). Wyższa dokładność może być uzyskana, jeśli substancje odniesienia zastosowane są strukturalnie związane z substancją badaną.

1.6.2. **Powtarzalność**

Oznaczenia powinny być prowadzone przynajmniej w dwóch kopiach. Wartości log K_{oc} wyprowadzone z poszczególnych pomiarów powinny mieścić się w zakresie 0,25 log jednostki.

1.6.3. **Odtwarzalność**

Doświadczenie uzyskane dotychczas przy zastosowaniu metody podtrzymuje jej zasadność. Badania metodą HPLC, z użyciem 48 substancji (głównie pestycydów), w odniesieniu do których były dostępne wiarygodne dane K_{oc} na glebach, dało współczynnik korelacji równy R = 0,95 (10)(11).

Między laboratoryjne badanie porównawcze z 11 uczestniczącymi laboratoriami przeprowadzono, aby poprawić i uwiarygodnić metodę (12). Wyniki podano w tabeli 2 dodatku.

1.7. OPISANIE METODY BADANIA

1.7.1. **Wstępne oszacowanie współczynnika adsorpcji**

Współczynnik podziału oktanol-woda P_{ow} (= K_{ow}) oraz, w pewnym zakresie, wodna rozpuszczalność może być używana jako wskaźnik dla zasięgu adsorpcji w szczególności dla niejonowych substancji, a w ten sposób może być używana do wstępnego znalezienia zakresu. Rozmaitość przydatnych korelacji opublikowano w odniesieniu do kilku grup substancji chemicznych (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

1.7.2. **Aparatura**

Wymagane są: cieczowy chromatograf połączony z bezpulsacyjną pompą i odpowiednim urządzeniem wykrywającym. Zalecane jest użycie zaworu wtryskowego z pętlą wtryskową. Należy użyć handlowego cyjanopropylu chemicznie związanego żywicą na bazie krzemionki (np. Hypersil i Zorbax CN). Kolumna ochronna z tego samego materiału może być ustawiona między systemem wtrysku i kolumną analityczną. Kolumny od różnych dostawców mogą różnić się znacznie w wydajności rozdzielania. Jako wytyczne, powinny być osiągnięte następujące masowe proporcje podziału k': log k' > 0,0 dla log K_{oc} = 3,0 i log k' > 0,4 dla log K_{oc} = 2,0 przy użyciu metanol/woda 55/45 % jako faza ruchoma.

1.7.3. **Fazy ruchome**

Zbadano kilka ruchomych faz i następujące dwie są zalecane:

— metanol/woda (55/45 % obj./obj.),

— metanol/0,01M bufor cytrynianowy pH 6,0 (55/45 % obj./obj.).

▼B

Metanol czystości HPLC oraz destylowana woda lub bufor cytrynianowy są używane do przygotowania elucyjnego rozpuszczalnika. Mieszanina jest odgazowywana przed użyciem. Powinna być używana elucja izokratyczna. Jeśli mieszaniny metanol/woda nie są właściwe, należy wypróbować inne mieszaniny rozpuszczalnik organiczny/woda, np. etanol/woda lub acetonitryl/woda. W odniesieniu do związków jonowych zaleca się użycie buforów w celu stabilizacji pH. Należy zachować ostrożność, aby zapobiec wytrącaniu się soli i uszkodzeniu kolumny, co zdarza się przy niektórych mieszaninach faza organiczna/bufor.

Nie można używać żadnych dodatków, takich jak odczynniki z wolną parą elektronową, ponieważ wpływają na właściwości sorpcji fazy stacjonarnej. Takie zmiany w fazie stacjonarnej są nieodwracalne. Z tej przyczyny obowiązkowe jest, aby doświadczenia z użyciem dodatków prowadzić w oddzielnych kolumnach.

1.7.4. **Substancje rozpuszczone**

Substancje badane i substancje odniesienia powinny być rozpuszczone w fazie ruchomej.

1.8. WYKONANIE BADANIA

1.8.1. **Warunki badania**

Temperatura w czasie trwania pomiarów powinna być rejestrowana. Użycie segmentu kolumny z kontrolowaną temperaturą jest silnie zalecane w celu zapewnienia stałych warunków w czasie trwania procesu kalibracji, oszacowania i pomiaru substancji badanej.

1.8.2. **Oznaczenie czasu martwego t_o**

Stosuje się w odniesieniu do określenia czasu martwego dla dwóch różnych metod (zob. także pkt 1.2).

1.8.2.1. *Określenie czasu martwego t_o za pomocą serii homologicznych*

Niniejsza procedura daje wiarygodne i standaryzowane wartości t_o. W zakresie szczegółowych informacji zob. metoda badania A.8: współczynnik podziału (n-oktanol/woda), metoda HPLC.

1.8.2.2. *Określenie czasu martwego t_o substancjami obojętnymi, niezatrzymywanymi przez kolumnę*

Niniejsza technika jest oparta na wtrysku roztworów formamidu, mocznika lub azotanu sodowego. Pomiary powinny być wykonane co najmniej dwa razy.

1.8.3. **Oznaczanie czasów retencji t_R**

Należy wybrać substancje odniesienia, jak opisano w pkt 1.3. Są one wstrzykiwane jako mieszaniny wzorcowe dla ustalenia ich czasów retencji, upewniając się, że czas retencji każdego wzorca nie jest zakłócony przez obecność innego wzorca. Kalibracja powinna być wykonywana w regularnych odstępach czasu, co najmniej dwa razy dziennie, w celu wyjaśnienia niespodziewanych zmian w działaniu kolumny. Dla najlepszego sposobu wstrzyknięcia kalibracyjne powinny być prowadzone przed i po wstrzyknięciu badanej substancji w celu zapewnienia, aby czas retencji nie zmieniał się. Substancje badane są wstrzykiwane oddzielnie, w ilościach tak małych, jak to możliwe (aby zapobiec przeciążeniu kolumny), a ich czasy retencji są określone.

▼B

W celu podniesienia zaufania do pomiarów, należy wykonać podwójne określenia. Wartości log K_{oc} uzyskane z poszczególnych pomiarów powinny wchodzić w zakres 0,25 log jednostki.

1.8.4. **Ocena**

Masowe proporcje podziału k' są obliczane od martwego czasu do czasów retencji t_R wybranych substancji odniesienia, według równania 4 (zob. pkt 1.2). Dane log k' dotyczące substancji odniesienia są wykreślane względem ich wartości log K_{oc} z doświadczeń równowagi wsadowej podanych w tabeli 1 i 3 dodatku. Stosując niniejszy wykres, wartość log k' badanej substancji jest zatem używana do określania wartości log K_{oc}. Jeśli rzeczywiste wyniki wskazują, że log K_{oc} substancji badanej jest poza zakresem kalibracji, badanie należy powtórzyć stosując inne, bardziej właściwe substancje odniesienia.

2. **DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

Sprawozdanie musi zawierać następujące informacje:

— identyczność substancji badanej i substancji odniesienia ich czystość i wartości pK_a, jeśli to stosowne,

— opis wyposażenia i warunki działania, np. typ i wymiary kolumn analitycznych (z ochroną), sposoby wykrywania, faza ruchoma (proporcje składników i pH), zakres temperatur w czasie trwania pomiarów,

— czas martwy i zastosowana metoda jego określenia,

— ilość substancji badanej i substancji odniesienia wprowadzonej do kolumny,

— czas retencji różnych związków odniesienia użytych do kalibracji,

— szczegółowe informacje dotyczące spasowania linii regresji (log k' vs log K_{oc}) i wykres linii regresji,

— dane średniej retencji i oszacowane wartości d log K_{oc} w odniesieniu do testowanego związku,

— chromatogramy.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 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, 1 67.

(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, pp. 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, pp. 227–231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 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, pp. 831–832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 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), pp. 121–128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 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), pp. 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, pp. 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), pp. 1373–1384.

▼B

DODATEK

Tabela 1

Porównanie wartości K_{oc} w odniesieniu do gleb i osadu ściekowego oraz obliczone wartości metodą rozdzielania HPLC ([1]), ([2])

Substancja	CAS No	log K_{oc} osad kanalizacyjny	log K_{oc} HPLC	Δ	log K_{oc} gleb	log K_{oc} HPLC	Δ
Atrazyna	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
Fenyloester kwasu benzoesowego	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
Anilina	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dichloroanilina	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), pp. 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), pp. 107–119.

Tabela 2

Wyniki interlaboratoryjnego badania porównawczego (11 uczestniczących laboratoriów) przeprowadzonego w celu poprawy i uwiarygodnienia metody HPLC ([1])

Substancja	Nr CAS	log K_{oc}	K_{oc}	log K_{oc}
		(OECD 106)	(metoda HPLC)	
Atrazine	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	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), pp. 1373–1384.

▼B

Tabela 3

Zalecane substancje odniesienia dla metody przeglądowej HPLC opartej o dane adsorpcji gleby

Substancja wzorcowa	Nr CAS	Log K_{oc} średnie wartości od równowagi wsadowej	Liczba danych K_{oc}	Log S.D.	Źródło
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-dimetylobenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-metylobenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Benzoesan metylu	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazyna	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-Nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Anilina	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-Dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazophos	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)
Metiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Barwnik Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-Trichlorobenzen	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)
Barwnik Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pyrazophos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diclofop metylowy	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenantren	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Barwnik Basic Blue 41 (mieszany)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
ODT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoefftiienten organischern Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01044 (1994).
(b) B.V. Oepen. W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, pp. 285–304.
(c) Dane dostarczone przez przemysł.

▼M7

C.20. **BADANIE WPŁYWU SUBSTANCJI NA ROZRODCZOŚĆ *DAPHNIA MAGNA***

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 211 (2012). Dotyczące badań wytyczne OECD są poddawane okresowemu przeglądowi w związku z postępem naukowym. Wytyczne dotyczące badań wpływu na rozrodczość nr 211 opracowano na podstawie wytycznej dotyczącej badań nr 202, część II, badanie wpływu substancji na rozrodczość *Dapnia* sp. (1984). Ogólnie przyjmuje się, że dane zgromadzone w trakcie badań przeprowadzanych zgodnie z wytyczną dotyczącą badań nr 202 mogą cechować się dużym stopniem zróżnicowania. Doprowadziło to do sytuacji, w której istotna część podejmowanych wysiłków służy identyfikowaniu przyczyn występowania tego rodzaju różnic w celu wypracowania lepszej metody badawczej. Wytyczną dotyczącą badań nr 211 opracowano w oparciu o rezultaty prowadzonej działalności badawczej, wyniki badań międzylaboratoryjnych oraz wyniki badań walidacyjnych przeprowadzonych w latach 1992 (1), 1994 (2) i 2008 (3).

Najistotniejsze różnice między początkową wersją wytycznych dotyczących badań wpływu na rozrodczość (wytyczna dotycząca badań nr 202 z 1984 r.) a ich drugą wersją (wytyczna dotycząca badań nr 211 z 1998 r.) są następujące:

— zalecanym gatunkiem do wykorzystania w badaniu jest *Daphnia magna*;

— badanie trwa 21 dni;

— jeżeli chodzi o badania półstatyczne, liczba zwierząt, na których należy przetestować każde badane stężenie, została zmniejszona z co najmniej 40, najlepiej podzielonych na cztery grupy po 10 zwierząt, do co najmniej 10 zwierząt utrzymywanych osobno (przy czym w przypadku badań przepływowych dopuszcza się możliwość zastosowania innych planów badania);

— przedstawiono bardziej szczegółowe zalecenia dotyczące ośrodka badania i warunków karmienia.

— wśród głównych różnic między drugą wersją wytycznych dotyczących badań wpływu na rozrodczość (wytyczne dotyczące badań nr 211 z 1998 r.) a niniejszą wersją wytycznych należy wymienić:

— dodano dodatek 7, w którym opisano procedury określania płci nowo wyklutych zwierząt w przypadkach, gdy jest to wymagane. Zgodnie z poprzednimi wersjami niniejszej metody badawczej zapewnienie określonej proporcji płci stanowi fakultatywny punkt końcowy;

— zmienna zależna liczby żyjącego potomstwa na zwierzę rodzicielskie, które przeżyło badanie, została uzupełniona dodatkową zmienną zależną związaną z rozrodczością zwierząt z gatunku Daphnia, tj. łączną liczbą żyjącego potomstwa pod koniec badania na każdą rozwielitkę rodzicielską na początku badania, co powala wykluczyć przypadkową lub niezamierzoną upadkowość zwierząt rodzicielskich z analizy. Wspomniana zmienna zależna ma na celu dostosowanie przedmiotowej zmiennej zależnej do innych metod badawczych wykorzystywanych do oceniania wpływu substancji na rozrodczość bezkręgowców. Ponadto, jeżeli chodzi o przedmiotową zmienną zależną, w niniejszej metodzie badawczej dopuszcza się możliwość usunięcia źródła błędu, tj. wpływu przypadkowej lub niezamierzonej upadkowości zwierząt rodzicielskich, w przypadku gdyby taka upadkowość wystąpiła w okresie narażenia na działanie substancji.

— na potrzeby podejścia ECx (np. EC10 lub EC50) i podejścia NOEC/LOEC uwzględniono dodatkowe wytyczne statystyczne dotyczące planu badania i przetwarzania wyników badania.

— wprowadzono również badanie graniczne.

Stosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

Głównym celem badania jest ocenienie wpływu substancji chemicznej na zdolność rozrodczą *Daphnia magna*. W tym celu młode samice *Daphnia* (zwierzęta rodzicielskie) w wieku poniżej 24 godzin na początku badania naraża się na działanie badanej substancji chemicznej dodawanej do wody w różnych stężeniach. Badanie trwa 21 dni. Pod koniec badania szacuje się łączną liczbę wyprodukowanego żyjącego potomstwa. Zdolność rozrodczą zwierząt rodzicielskich można wyrazić również w innej formie (np. podając liczbę żyjącego potomstwa wyprodukowanego na dane zwierzę rodzicielskie na dzień począwszy od dnia wyprodukowania pierwszego potomstwa), ale dane na ten temat należy zgłaszać

▼M7

niezależnie od łącznej liczby wyprodukowanego żyjącego potomstwa odnotowanej pod koniec badania. Z uwagi na specyficzny charakter planu badania półstatycznego w porównaniu z metodami badawczymi stosowanymi w kontekście badania rozrodczości bezkręgowców, dopuszcza się również możliwość zliczenia liczby żyjącego potomstwa wyprodukowanego przez poszczególne zwierzęta rodzicielskie. W odróżnieniu od pozostałych metod badawczych stosowanych w kontekście badania rozrodczości bezkręgowców, zastosowanie takiej metody zliczania żyjącego potomstwa pozwala wykluczyć z analizy danych określoną liczbę potomstwa, jeżeli zwierzę rodzicielskie, które wyprodukowało to potomstwo, padnie w przypadkowy lub nieumyślny sposób w okresie badania. Dlatego też w przypadku wystąpienia upadkowości wśród zwierząt rodzicielskich w kontrpróbach narażonych na działanie substancji należy ustalić, czy taka upadkowość przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, np. czy odnotowuje się istotną regresję odpowiedzi w stosunku do krzywej stężenia substancji chemicznej o nachyleniu dodatnim (w tym celu można zastosować badanie statystyczne zbliżone do badania tendencji Cochrana-Armitage'a). Jeżeli upadkowość nie przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, kontrpróby, w których odnotowano upadkowość zwierząt rodzicielskich, powinny zostać wykluczone z analizy wyniku badania. Jeżeli upadkowość przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, upadkowość zwierząt rodzicielskich powinna zostać oznaczona jako skutek narażenia na działanie badanej substancji chemicznej, a kontrpróby nie powinny zostać wykluczone z analizy. Jeżeli zwierzę rodzicielskie padnie w trakcie badania, np. przypadkowo wskutek niewłaściwego traktowania lub wypadku lub nieumyślnie z uwagi na wystąpienie niewyjaśnionego zdarzenia niezwiązanego z wpływem badanej substancji chemicznej, lub okaże się zwierzęciem płci męskiej, kontrpróbę wyklucza się z analizy (aby uzyskać dodatkowe informacje, zob. pkt 51). Toksyczne oddziaływanie badanej substancji chemicznej na zdolność rozrodczą wyraża się jako ECx, dopasowując stosowne dane do odpowiedniego modelu w drodze regresji liniowej w celu oszacowania stężenia, które mogłoby doprowadzić do obniżenia zdolności rozrodczej o odpowiednio x %, lub alternatywnie jako wartość NOEC/LOEC (4). *Najlepiej byłoby, aby badane stężenia obejmowały najniższe zastosowane stężenia, przy których obserwuje się zmiany (np. EC_{10}), co oznacza, że wartość tę oblicza się w drodze interpolacji, a nie ekstrapolacji.*

Należy również odnotować wskaźnik przeżycia zwierząt rodzicielskich oraz czas, jaki upłynął do chwili wyklucia się pierwszego lęgu. Można również zbadać inne skutki narażenia na działanie substancji chemicznej dla parametrów takich jak wzrost (np. długość) oraz, potencjalnie, wrodzony wskaźnik przyrostu populacji (zob. pkt 44).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

Wyniki badania ostrej toksyczności (zob. rozdział C.2 niniejszego załącznika: badanie nagłego unieruchomienia *Daphnia* sp.) przeprowadzonego na *Daphnia magna* mogą okazać się pomocne przy wyborze odpowiedniego zakresu badanych stężeń w badaniach rozrodczości. Rozpuszczalność w wodzie i prężność par badanej substancji chemicznej powinna być znana, przy czym należy przyjąć wiarygodną metodę analityczną wykorzystywaną do oznaczania ilościowego zawartości substancji chemicznej w roztworach do badań o znanej sprawności odzyskowej i granicy oznaczalności.

Informacje na temat badanej substancji chemicznej, które mogą okazać się przydatne przy ustalaniu warunków badania, obejmują wzór strukturalny, czystość substancji chemicznej, stabilność przy narażeniu na działanie światła, stabilność w warunkach badania, stałą dysocjacji, P_{ow} oraz wyniki badania szybkiej biodegradowalności (zob. rozdziały C.4 (ustalanie „szybkiej" biodegradowalności) i C.29 (szybka biodegradowalność – zawartość CO_2 w zamkniętych naczyniach) niniejszego załącznika).

WAŻNOŚĆ BADANIA

Aby badanie było ważne, powinny być spełnione następujące kryteria wykonania w przypadku prób kontrolnych:

— upadkowość zwierząt rodzicielskich (samic *Daphnia*) nie może przekraczać 20 % w chwili zakończenia badania;

— średnia liczba żyjącego potomstwa wyprodukowanego przez zwierzę rodzicielskie, które przeżyło do zakończenia badania wynosi ≥ 60.

Uwaga: Takie samo kryterium ważności (20 %) można wykorzystać przy badaniu przypadkowej i nieumyślnej upadkowości w próbach kontrolnych, a także przy analizowaniu poszczególnych badanych stężeń.

▼M7

OPIS METODY

Aparatura

Naczynie badawcze i inna aparatura, które będą się stykały z roztworami do badań, powinny zostać wykonane w całości ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału. Naczyniami badawczymi są zazwyczaj szklane zlewki.

Ponadto przy przeprowadzaniu badania konieczne może okazać się skorzystanie z niektórych lub z wszystkich wymienionych poniżej urządzeń:

— miernika tlenu (wyposażonego w mikroelektrodę lub inne odpowiednie urządzenie wykorzystywane do pomiaru stężenia rozpuszczonego tlenu w próbkach o małej objętości);

— odpowiedniej aparatury do kontrolowania temperatury;

— pehametru;

— urządzeń wykorzystywanych do oznaczania twardości wody;

— urządzeń wykorzystywanych do oznaczania stężenia całkowitego węgla organicznego w wodzie lub urządzeń wykorzystywanych do oznaczania chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT);

— odpowiedniej aparatury do kontrolowania warunków oświetlenia i do pomiaru światłości.

Organizm doświadczalny

Gatunkiem wykorzystywanym w badaniu jest *Daphnia magna* Straus ([1]).

Najlepiej, aby klon został zidentyfikowany w drodze typowania genetycznego. Badania (1) pokazują, że wydajność reprodukcyjna klonu A (pochodzącego z IRCHA we Francji) (5) regularnie spełnia kryterium ważności wyznaczone dla średniej liczby żyjącego potomstwa wynoszącej ≥60 na zwierzę rodzicielskie, które przeżyło badanie, w przypadku gdy warunki hodowli odpowiadają warunkom opisanym w niniejszej metodzie badawczej. Dopuszcza się jednak możliwość wykorzystania innych klonów, jeżeli uda się wykazać, że warunki hodowli zwierząt z gatunku *Daphnia* spełniają kryteria ważności wyznaczone dla danego badania.

Na początku badania wiek zwierząt nie powinien przekraczać 24 godzin, przy czym zwierzęta nie powinny być potomstwem z pierwszego wylęgu. Zwierzęta powinny pochodzić ze zdrowej populacji (tj. z populacji, w której nie odnotowano oznak świadczących o wystąpieniu stresu, takich jak wysoka upadkowość, obecność samców i siodełek, opóźnienia w produkcji pierwszego lęgu, obecność przebarwionych zwierząt itp.). Zwierzęta pochodzące z populacji powinny przebywać w warunkach hodowlanych (światło, temperatura, ośrodek, pasza i liczba zwierząt na jednostkę objętości) zbliżonych do warunków, które mają zostać zastosowane w badaniu. Jeżeli ośrodek, w którym zwierzęta z gatunku *Daphnia* mają przebywać w trakcie badania, różni się od ośrodka, w którym zwierzęta z gatunku *Daphnia* są standardowo utrzymywane, za dobrą praktykę uznaje się ustanowienie okresu aklimatyzacji przed badaniem wynoszącego zwykle około trzech tygodni (tj. odpowiadającego długości życia jednego pokolenia), aby zapobiec wystąpieniu stresu u zwierząt rodzicielskich.

Ośrodek badawczy

Zaleca się, aby przedmiotowe badanie zostało przeprowadzone w pełni określonym ośrodku. Może to pozwolić uniknąć konieczności wprowadzania dodatkowych elementów (np. wodorostów, ekstraktów glebowych), które trudno jest scharakteryzować, przyczyniając się tym samym do zwiększenia możliwości zapewnienia harmonizacji procedur stosowanych w poszczególnych laboratoriach. Ośrodki Elendt M4 (6) i M7 (zob. dodatek 2) uznano za odpowiednie do tego celu. Inne ośrodki (np. (7) (8)) mogą jednak również zostać uznane za odpowiednie, o ile będzie można wykazać, że wyniki osiągane przez daną hodowlę zwierząt z gatunku *Daphnia* spełniają kryteria ważności wyznaczone w ramach badania.

([1]) Dopuszcza się również możliwość wykorzystania innych rozwielitek, jeżeli spełnią one – w stosownych przypadkach – obowiązujące kryteria ważności (kryterium ważności dotyczące zdolności rozrodczej w próbach kontrolnych powinno obowiązywać w odniesieniu do *wszystkich* gatunków). W przypadku wykorzystania innych rozwielitek należy wyraźnie określić wybrane gatunki i uzasadnić ich wybór.

▼M7

W przypadku korzystania z ośrodków, w których występują niezidentyfikowane elementy dodatkowe, takie elementy powinny zostać wyraźnie określone, a w sprawozdaniu z badania należy przedstawić informacje na temat ich składu, zwracając szczególną uwagę na zawartość węgla, ponieważ czynnik ten może wywrzeć wpływ na podawaną paszę. Zaleca się oznaczenie całkowitego węgla organicznego lub chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) w preparatach podstawowych, w których występuje dodatkowy element organiczny, oraz sporządzenie szacunków dotyczących wpływu całkowitego węgla organicznego / chemicznego zapotrzebowania na tlen na ośrodek wykorzystywany w badaniu. Ponadto zaleca się, aby poziomy stężenia całkowitego węgla organicznego w ośrodku (tj. przed dodaniem glonów) utrzymywały się poniżej 2 mg/l (9).

Przy przeprowadzaniu badań przy wykorzystaniu substancji chemicznych zawierających metale należy pamiętać, że właściwości ośrodka wykorzystywanego w badaniu (np. twardość, zdolność chelatująca) mogą wywrzeć wpływ na toksyczność badanej substancji chemicznej. Dlatego też zaleca się korzystanie z ośrodka, który został w pełni określony. Jednak obecnie jedynymi w pełni określonymi ośrodkami, co do których wiadomo, że są odpowiednie do celów związanych z długoterminową hodowlą zwierząt z gatunku *Daphnia magna*, są ośrodki Elendt M4 i M7. W składzie obydwu tych ośrodków występuje czynnik chelatujący EDTA. Z przeprowadzonych badań (2) wynika, że poziom „toksyczności pozornej" kadmu jest zazwyczaj niższy, w przypadku gdy badanie wpływu na rozrodczość przeprowadza się w ośrodkach M4 i M7 niż w przypadku gdy badanie to przeprowadza się w ośrodkach, w których nie występuje EDTA. Dlatego też nie zaleca się badania substancji chemicznych zawierających metale w ośrodkach M4 i M7; w przypadku takich substancji chemicznych należy również unikać korzystania z innych ośrodków zawierających czynniki chelatujące. W przypadku substancji chemicznych zawierających metale można rozważyć możliwość skorzystania z alternatywnych ośrodków, takich jak np. odtworzona twarda woda słodka spełniająca normy ASTM (9), która nie zawiera EDTA. Ośrodek stworzony dzięki połączeniu odtworzonej twardej wody słodkiej i ekstraktu z wodorostów (10) uznaje się za odpowiedni do celów długoterminowej hodowli *Daphnia magna* (2).

Stężenie rozpuszczonego tlenu na początku badania i w jego trakcie powinno przekraczać 3 mg/l. Wartość pH powinna mieścić się w przedziale 6–9 i zazwyczaj nie powinna różnić się o więcej niż 1,5 jednostki w ramach danego pojedynczego badania. Zaleca się, aby poziom twardości (wyrażony jako stężenie $CaCO_3$) przekraczał 140 mg/l. Wydajność reprodukcyjna odnotowana w badaniach przeprowadzonych przy takim i wyższym poziomie twardości spełniała kryteria ważności (11) (12).

Roztwory do badań

Roztwory do badań wybranych stężeń przygotowuje się zazwyczaj, rozcieńczając roztwór podstawowy. Roztwory podstawowe powinny być w miarę możliwości przygotowywane bez użycia jakichkolwiek rozpuszczalników lub środków dyspergujących, poprzez mechaniczne mieszanie lub wstrząsanie badanych substancji chemicznych w ośrodku wykorzystywanym w badaniu, np. poprzez wstrząsanie, bełtanie lub sonikację lub przy zastosowaniu innych stosownych metod. Przed wprowadzeniem organizmów doświadczalnych zaleca się poddanie układów badawczych działaniu badanej substancji chemicznej w stężeniach, które mają być zastosowane w badaniu, przez okres konieczny do wykazania utrzymania stabilnych stężeń ekspozycyjnych. Jeżeli badana substancja chemiczna jest trudno rozpuszczalna w wodzie, należy zastosować procedury postępowania z trudnymi substancjami opisane w wytycznych OECD (13). Należy unikać stosowania rozpuszczalników lub środków dyspergujących, choć w niektórych przypadkach może okazać się to konieczne, aby przygotować roztwór podstawowy o stężeniu odpowiednim do tego, by mógł być podawany zwierzętom w określonych dawkach.

Poza próbą kontrolną z wykorzystaniem badanych stężeń należy również wykorzystać próbę kontrolną z wodą rozcieńczającą wraz z odpowiednimi kontrpróbami oraz – jeżeli okaże się to nieuniknione – próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem wraz z odpowiednimi kontrpróbami. W badaniu należy korzystać wyłącznie z rozpuszczalników lub środków dyspergujących, co do których stwierdzono, że nie wywierają żadnego istotnego wpływu na zmienną zależną lub że wywierają wyłącznie minimalny wpływ na zmienną zależną. Przykłady odpowiednich rozpuszczalników (np. aceton, etanol, metanol, dimetyloformamid i glikol trietylenowy) i środków dyspergujących (np. Cremophor RH40, metyloceluloza 0,01 % i HCO-40) przedstawiono w (13). W przypadku zastosowania

▼M7

rozpuszczalnika lub środka dyspergującego stężenie końcowe tego rozpuszczalnika lub środka dyspergującego nie może przekraczać 0,1 ml/l (13) i powinno mieć taką samą wartość we wszystkich naczyniach badawczych z wyjątkiem naczynia wykorzystywanego na potrzeby próby kontrolnej z wodą rozcieńczającą. Należy jednak dołożyć wszelkich starań, aby utrzymać stężenie rozpuszczalnika na możliwie jak najniższym poziomie.

PROCEDURA

Warunki narażenia na działanie substancji

Czas trwania

Badanie trwa 21 dni.

Obciążenie

Zwierzęta rodzicielskie utrzymuje się pojedynczo, po jednym na naczynie badawcze, w ośrodku o objętości wynoszącej zazwyczaj 50–100 ml w poszczególnych naczyniach badawczych (w przypadku *Daphnia magna* dopuszcza się możliwość zapewnienia ośrodka o mniejszej objętości, w szczególności dla mniejszych rozwielitek, np. *Ceriodaphnia dubia*), chyba że w planie badania przewidziano konieczność przeprowadzenia badania przepływowego.

Zapewnienie ośrodka o większej objętości może niekiedy okazać się konieczne, aby spełnić wymagania przewidziane w procedurze analitycznej wykorzystywanej w celu oznaczenia stężenia badanej substancji chemicznej, choć dopuszcza się również możliwość łączenia kontrprób na potrzeby analizy chemicznej. W przypadku zastosowania objętości wyższych niż 100 ml konieczne może okazać się zwiększenie dawki podawanej zwierzętom z gatunku *Daphnia*, aby zapewnić odpowiednią dostępność pokarmu i zgodność z kryteriami ważności.

Zwierzęta doświadczalne

Jeżeli chodzi o badania półstatyczne, takie badania przeprowadza się na co najmniej 10 zwierzętach utrzymywanych pojedynczo na potrzeby każdego badanego stężenia oraz na co najmniej 10 zwierzętach utrzymywanych pojedynczo w ramach serii kontrolnych.

Jeżeli chodzi o badania przepływowe, za odpowiednie uznano przeprowadzenie takiego badania na 40 zwierzętach podzielonych na cztery grupy liczące po 10 zwierząt na potrzeby każdego badanego stężenia (1). Dopuszcza się również możliwość wykorzystania mniejszej liczby organizmów doświadczalnych, przy czym zaleca się, aby badanie każdego stężenia przeprowadzać na co najmniej 20 zwierzętach podzielonych na dwie kontrpróby lub większą ich liczbę o równej liczbie zwierząt (np. cztery kontrpróby po pięć rozwielitek). Należy zwrócić uwagę na fakt, że w przypadku badań, w których zwierzęta przetrzymuje się w grupach, wykluczenie potomstwa z analizy statystycznej w przypadku wystąpienia niezamierzonej/przypadkowej upadkowości po rozpoczęciu aktywności rozrodczej nie będzie możliwe; dlatego też w takich przypadkach zdolność rozrodczą należy ujmować jako łączną liczbę żyjącego potomstwa wyprodukowanego przez zwierzę rodzicielskie, które żyło w chwili rozpoczęcia badania.

Do naczyń badawczych należy wprowadzić substancję chemiczną w odpowiednim stężeniu, a wszelkie dalsze czynności związane z naczyniami badawczymi należy przeprowadzać losowo. Niezastosowanie się do tych zasad może doprowadzić do wystąpienia błędów systematycznych, które mogą zostać uznane za skutek wywołany stężeniem substancji. W szczególności w przypadku, gdy jednostki doświadczalne obsługuje się zgodnie z porządkiem poddawania działaniu substancji chemicznej lub podawania substancji w określonych stężeniach, skutek wywołany upływem czasu, np. zmęczenie operatora lub innego rodzaju błąd, może wywołać poważniejszy wpływ przy wyższych stężeniach substancji. Ponadto jeżeli istnieje prawdopodobieństwo, że warunki początkowe lub warunki otoczenia w ramach badania, takie jak położenie w laboratorium, wywrą wpływ na wyniki badania, należy rozważyć możliwość wstrzymania badania.

Karmienie

Zaleca się, aby zwierzęta w badaniach półstatycznych były karmione codziennie, a w przypadku gdy nie będzie to możliwe – co najmniej trzy razy w tygodniu (tj. przy wymianie ośrodków). Należy wziąć pod uwagę możliwość rozcieńczenia stężeń ekspozycyjnych wskutek dodania paszy i należy w miarę możliwości nie dopuszczać do wystąpienia takich sytuacji poprzez korzystanie z zagęszczonych zawiesin z glonów. Należy zgłaszać wszelkie przypadki odejścia od tych zasad (np. przy przeprowadzaniu badań przepływowych).

Zaleca się, aby w trakcie badania zwierzęta rodzicielskie karmić żywymi komórkami glonów należących do jednego lub większej liczby następujących gatunków: *Chlorella*, *Pseudokirchneriella subcapitata* (dawniej *Selenastrum capricornutum*) oraz *Desmodesmus subspicatus* (dawniej *Scenedesmussubspicatus*). Podawany pokarm powinien zawierać odpowiednią ilość węgla organicznego (C), jaką

▼M7

należy dostarczyć poszczególnym zwierzętom rodzicielskim. Przeprowadzone badania (14) wykazały, że w przypadku *Daphnia magna* dawka pokarmu wynosząca od 0,1 mg do 0,2 mg C na zwierzę z gatunku *Daphnia* na dzień jest odpowiednia do tego, by dane zwierzę mogło wyprodukować liczbę żyjącego potomstwa wymaganą do spełnienia kryteriów ważności ustanowionych dla danego badania. Dawki pokarmu można podawać w regularnych odstępach czasu przez cały okres badania albo – w razie potrzeby – na początku badania można podawać pokarm z mniejszą częstotliwością, zwiększając ją w trakcie badania w miarę wzrostu zwierząt rodzicielskich. W takim przypadku dawki pokarmu powinny nadal utrzymywać się w zalecanym zakresie 0,1–0,2 mg C na zwierzę z gatunku *Daphnia* na dzień przez cały okres badania.

Jeżeli na potrzeby zapewnienia podania odpowiedniej dawki stosuje się wskaźniki zastępcze, np. liczbę komórek glonów lub absorbancję światła (tj. jeżeli takie wskaźniki stosuje się w celu usprawnienia przebiegu badania z uwagi na czasochłonność procesu pomiaru zawartości węgla), każde laboratorium powinno opracować swój własny nomogram zestawiający wartość danego wskaźnika zastępczego z zawartością węgla danej hodowli glonów (aby zapoznać się ze wskazówkami w zakresie sporządzania nomogramu, zob. dodatek 3). Nomogramy należy sprawdzać co najmniej raz do roku lub częściej, jeżeli doszło do zmiany warunków hodowli glonów. Ustalono, że absorbancja światła stanowi lepszy wskaźnik zastępczy dla zawartości węgla niż liczba komórek (15).

Zwierzęta z gatunku *Daphnia* należy karmić zagęszczoną zawiesiną z glonów, aby ograniczyć objętość przenoszonego do naczyń badawczych ośrodka zawierającego hodowlę glonów do minimum. Glony można zagęścić poprzez ich odwirowanie i ponowne utworzenie zawiesiny w ośrodku zawierającym hodowlę zwierząt z gatunku *Daphnia*.

Oświetlenie

Oświetlanie przez 16 godzin z intensywnością nieprzekraczająca 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ mierzoną na powierzchni wody w danym naczyniu. Dla przyrządów do pomiaru światła kalibrowanych w luksach zalecanej wartości światłości wynoszącej 15–20 μE · m-2 · s-1 odpowiada w przybliżeniu równoważny zakres 1 000–1 500 luksów dla chłodnego światła białego.

Temperatura

Temperatura ośrodków wykorzystywanych w badaniu powinna mieścić się w zakresie 18–22 °C. Jeżeli będzie to możliwe, w ramach żadnego pojedynczego badania temperatura w ujęciu dziennym nie powinna jednak odbiegać od tego zakresu o więcej niż 2 °C w (np. 18–20, 19–21 lub 20–22 °C). Właściwe może być użycie dodatkowego naczynia badawczego do celów monitorowania temperatury.

Napowietrzanie

W czasie trwania badania naczynia badawcze nie powinny być napowietrzane.

Plan badania

Badanie ustalające zakres

W razie potrzeby przeprowadzane jest badanie ustalające zakres, na przykład obejmujące pięć stężeń badanej substancji chemicznej i dwie kontrpróby dla każdej grupy badanej i kontrolnej. Dodatkowe informacje dotyczące ostrej toksyczności dla *Daphnia* lub innych organizmów wodnych, uzyskane na podstawie badań podobnych substancji chemicznych lub literatury, mogą okazać się przydatne również przy podejmowaniu decyzji dotyczącej zakresu stężeń, jakie mają zostać użyte w badaniu ustalającym zakres.

Badanie ustalające zakres trwa 21 dni albo dostateczny okres pozwalający w wiarygodny sposób prognozować poziom skutków. Na koniec badania oceniana jest rozrodczość *Daphnia*. Należy odnotować liczbę zwierząt rodzicielskich i występowanie potomstwa.

Badanie ostateczne

Zwykle powinno być co najmniej pięć badanych stężeń, w tym stężenie efektywne (np. EC_x), ułożonych w serii geometrycznej ze współczynnikiem rozdziału najlepiej nieprzekraczającym 3,2. Należy zastosować właściwą liczbę kontrprób dla każdego badanego stężenia (zob. pkt 24–25). Jeżeli użyto mniej niż pięć

▼M7

stężeń, należy podać uzasadnienie. Nie należy badać substancji chemicznych powyżej ich granicy rozpuszczalności w ośrodku użytym w badaniu. Przed przeprowadzeniem doświadczenia wskazane jest uwzględnienie mocy statystycznej planu badań i zastosowanie odpowiednich metod statystycznych (4). Przy ustalaniu zakresu stężeń należy uwzględnić następujące kwestie:

(i) jeżeli szacowane jest EC_x odnoszące się do wpływu na rozrodczość, wskazane jest użycie wystarczających stężeń w celu określenia EC_x z właściwym poziomem ufności. Najlepiej byłoby, gdyby zastosowane badane stężenia zawierały w swoim zakresie szacowane EC_x, tak aby EC_x obliczane było w drodze interpolacji, a nie ekstrapolacji. Na potrzeby dalszej analizy statystycznej korzystne jest zastosowanie większej liczby badanych stężeń (np. 10) i mniejszej liczby kontrprób dla każdego stężenia (np. 5, dzięki czemu całkowita liczba pojemników będzie stała) oraz 10 prób kontrolnych.

(ii) jeżeli szacowane jest LOEC lub NOEC, najniższe badane stężenie powinno być wystarczająco niskie, aby zdolność rozrodcza przy tym stężeniu nie była znacząco niższa niż w próbie kontrolnej. W innym przypadku badanie będzie musiało być powtórzone ze zmniejszonym najniższym stężeniem;

(iii) jeżeli szacowane jest LOEC lub NOEC, najwyższe badane stężenie powinno być wystarczająco wysokie, aby zdolność rozrodcza przy tym stężeniu była znacząco niższa niż w próbie kontrolnej. W innym przypadku badanie należy powtórzyć z podwyższonym najwyższym stężeniem, chyba że w badaniu wstępnym jako najwyższe badane stężenie zastosowano maksymalne badane stężenie wymagane do badania wpływu długoterminowego (tj. 10 mg/l).

Jeżeli przy najwyższym stężeniu w badaniu ustalającym zakres (np. przy stężeniu wynoszącym 10 mg/l) nie obserwuje się wpływu lub jeżeli na podstawie braku toksyczności dla innych organizmów lub małego/braku wchłaniania istnieje duże prawdopodobieństwo, że badana substancja chemiczna ma niską toksyczność lub nie jest toksyczna, badanie wpływu na rozrodczość można przeprowadzić jako badanie graniczne, stosując badane stężenie wynoszące np. 10 mg/l oraz kontrolę. Należy zastosować dziesięć kontrprób zarówno w odniesieniu do grupy badanej, jak i grupy kontrolnej. W przypadku gdy konieczne jest przeprowadzenie badania granicznego metodą przepływu dyfuzyjnego, wystarczy mniejsza liczba kontrprób. Badanie graniczne będzie okazją do wykazania, że przy stężeniu granicznym nie występuje statystycznie istotny wpływ, ale jeśli wpływ jest rejestrowany, zazwyczaj wymagane będzie pełne badanie.

Kontrole

Do serii badanej dodatkowo musi być włączona jedna seria kontrolna ośrodka użytego w badaniu oraz, w stosownych przypadkach, jedna seria kontrolna zwierająca rozpuszczalnik lub środek dyspergujący. Gdy stosowany jest rozpuszczalnik lub środek dyspergujący, ich stężenie powinno być takie samo jak używane w zbiornikach zawierających badaną substancję chemiczną. Należy zastosować właściwą liczbę kontrprób (zob. pkt 23–24).

Na ogół w dobrze przebiegającym badaniu współczynnik zmienności średniej liczby żyjącego potomstwa na zwierzę rodzicielskie w próbach kontrolnych powinien wynosić ≤ 25 %; współczynnik ten należy podać w odniesieniu do planów badania z wykorzystaniem pojedynczo trzymanych zwierząt.

Wymiana ośrodka użytego do badania

Częstotliwość wymiany ośrodka będzie zależała od stabilności badanej substancji chemicznej, lecz powinna wynosić co najmniej trzy razy na tydzień. Jeżeli z wstępnych badań stabilności (zob. pkt 7) wynika, że stężenie badanej substancji chemicznej nie jest stabilne (tj. poza zakresem 80–120 % stężenia nominalnego lub spada poniżej 80 % mierzonego stężenia początkowego) w maksymalnym okresie wymiany (tj. przez trzy dni), należy rozważyć częstszą wymianę ośrodka lub zastosowanie badania przepływowego.

▼M7

Gdy ośrodek jest wymieniany w badaniach półstatycznych, przygotowuje się drugą serię naczyń badawczych, a zwierzęta rodzicielskie są do nich przenoszone, na przykład szklaną pipetą o odpowiedniej średnicy. Należy zminimalizować objętość ośrodka przenoszonego wraz z *Daphnia*.

Obserwacje

Wyniki obserwacji dokonanych w trakcie trwania badania należy odnotować w arkuszach danych (zob. przykłady w dodatkach 4 i 5). Jeśli inne pomiary są wymagane (zob. pkt 44), konieczne mogą być dodatkowe obserwacje.

Potomstwo

Potomstwo spłodzone przez każde zwierzę rodzicielskie najlepiej codziennie usuwać i liczyć od momentu pojawienia się pierwszego wylęgu, aby powstrzymać je przed zjadaniem pokarmu przeznaczonego dla zwierząt rodzicielskich. Do celów niniejszej metody badawczej potrzebne jest tylko liczenie żyjącego potomstwa, lecz obecność obumarłych jaj lub martwego potomstwa również należy odnotować.

Upadkowość

Upadkowość zwierząt rodzicielskich powinna być rejestrowana najlepiej codziennie albo przynajmniej tak często, jak liczone jest potomstwo.

Inne parametry

Chociaż niniejsza metoda badawcza jest zasadniczo przeznaczona do oceny skutków dla zdolności rozrodczej, możliwe jest, że inne skutki również zostaną oznaczone ilościowo w stopniu wystarczającym do przeprowadzenia analizy statystycznej. Można odnotować zdolność rozrodczą każdego zwierzęcia rodzicielskiego, które przeżyło badanie, tj. liczbę żyjącego potomstwa spłodzonego przez to zwierzę podczas badania. Tę zdolność rozrodczą można porównać z główną zmienną zależną (zdolnością rozrodczą zwierzęcia rodzicielskiego na początku badania, które to zwierze nie padło w przypadkowy lub niezamierzony sposób w okresie badania). W przypadku wystąpienia upadkowości wśród zwierząt rodzicielskich w kontrpróbach narażonych na działanie substancji należy ustalić, czy taka upadkowość przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, np. czy odnotowuje się istotną regresję odpowiedzi w stosunku do krzywej stężenia substancji chemicznej o nachyleniu dodatnim (w tym celu można zastosować badanie statystyczne zbliżone do badania tendencji Cochrana-Armitage'a). Jeżeli upadkowość nie przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, kontrpróby, w których odnotowano upadkowość zwierząt rodzicielskich, powinny zostać wykluczone z analizy wyniku badania. Jeżeli upadkowość przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, upadkowość zwierząt rodzicielskich powinna zostać oznaczona jako skutek narażenia na działanie badanej substancji chemicznej, a kontrpróby nie powinny zostać wykluczone z analizy wyniku badania. Wysoce pożądane są pomiary rozwoju, ponieważ dostarczają one informacji dotyczących możliwych efektów subletalnych, które mogą być użyteczne jako uzupełnienie samych pomiarów rozrodczości; zalecany jest pomiar długości zwierząt rodzicielskich (tj. długość ciała, wyłączając kolec odbytowy) na końcu badania. Inne parametry, które można zmierzyć lub obliczyć, obejmują: czas do spłodzenia pierwszego wylęgu (i kolejnych wylęgów), liczbę i wielkość wylęgów na zwierzę, liczbę wylęgów przerwanych, obecność samców wśród osobników nowo wyklutych (OECD, 2008) lub obecność efipiów oraz ewentualnie wewnętrzny wskaźnik przyrostu populacji (zob. definicja w dodatku 1 oraz informacje na temat określania płci osobników nowo wyklutych w dodatku 7).

Częstotliwość oznaczeń i pomiarów analitycznych

Stężenie tlenu, temperatura, wartości twardości i pH powinny być mierzone co najmniej raz tygodniowo, w świeżych i starych ośrodkach, w próbach kontrolnych i w najwyższym stężeniu badanej substancji chemicznej.

W trakcie badania stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w regularnych odstępach czasu.

W badaniach półstatycznych w przypadku gdy oczekuje się, że stężenie badanej substancji chemicznej pozostanie w zakresie ± 20 % stężenia nominalnego (tj. w zakresie 80–120 % – zob. pkt 6, 7 i 39), zaleca się przeanalizowanie co

▼M7

najmniej najniższego i najwyższego badanego stężenia świeżo po przygotowaniu i przy wymianie jednokrotnie podczas pierwszego tygodnia badania (tj. analizy powinny być dokonane na próbce z tego samego roztworu – świeżo przygotowanego i przy wymianie). Później te oznaczenia należy powtarzać przynajmniej w odstępach tygodniowych.

W przypadku badań, w których nie oczekuje się, że stężenie badanej substancji chemicznej pozostanie w zakresie ± 20 % stężenia nominalnego, konieczne jest analizowanie wszystkich stężeń – roztworów świeżo przygotowanych i przy wymianie. W odniesieniu do tych badań, w których zmierzone stężenie wyjściowe badanej substancji chemicznej nie mieści się w zakresie ± 20 % stężenia nominalnego, lecz można przedstawić wystarczające dowody wykazujące, że stężenia początkowe są powtarzalne i stabilne (tj. w zakresie 80–120 % stężeń początkowych), oznaczenia chemiczne można ograniczyć w 2. i 3. tygodniu badania do najwyższego i najniższego badanego stężenia. We wszystkich przypadkach oznaczenie stężeń badanej substancji chemicznej przed wymianą należy przeprowadzić tylko na jednym naczyniu z kontrpróbą dla każdego badanego stężenia.

Jeżeli stosowane jest badanie przepływowe, odpowiednim schematem pobierania próbek jest schemat podobny do opisanego w odniesieniu do badań półstatycznych (lecz pomiar „starych” roztworów nie ma zastosowania w tym przypadku). Wskazane może być jednak zwiększenie liczby pobrań próbek podczas pierwszego tygodnia (np. wykonanie trzech zestawów pomiarów) w celu zapewnienia, aby badane stężenia pozostawały stałe. W tego typu badaniu należy codziennie sprawdzać natężenie przepływu rozcieńczalnika i badanej substancji chemicznej.

Jeśli istnieją dowody na to, że stężenie badanej substancji chemicznej było zadowalająco utrzymywane w granicach ± 20 % nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia przez cały czas trwania badania, to wyniki mogą opierać się na wartości nominalnej lub zmierzonej wartości początkowej. Jeśli odchylenie od nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia jest większe niż ± 20 %, wyniki należy wyrazić w średniej ważonej w czasie (zob. wytyczne dotyczące obliczeń w dodatku 6).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

Celem niniejszego badania jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na zdolność rozrodczą. W odniesieniu do każdego naczynia badawczego (tj. kontrpróby) należy obliczyć całkowitą liczbę żyjącego potomstwa na zwierzę rodzicielskie. Ponadto rozrodczość można obliczyć na podstawie płodzenia żywego potomstwa przez żyjący organizm rodzicielski. Zmienną zależną najistotniejszą z ekologicznego punktu widzenia jest jednak całkowita liczba żyjącego potomstwa spłodzonego przez zwierzę rodzicielskie, które nie padło w sposób przypadkowy ([1]) lub niezamierzony ([2]) w trakcie badania. Jeśli w trakcie badania zwierzę rodzicielskie padnie w sposób przypadkowy lub niezamierzony lub okaże się samcem, daną kontrpróbę wyklucza się z analizy. Analiza jest wtedy oparta na zmniejszonej liczbie kontrprób. W przypadku wystąpienia upadkowości wśród zwierząt rodzicielskich w kontrpróbach narażonych na działanie substancji należy ustalić, czy taka upadkowość przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, np. czy odnotowuje się istotną regresję odpowiedzi w stosunku do krzywej stężenia substancji chemicznej o nachyleniu dodatnim (w tym celu można zastosować badanie statystyczne zbliżone do badania tendencji Cochrana-Armitage'a). Jeżeli upadkowość nie przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, kontrpróby, w których odnotowano upadkowość zwierząt rodzicielskich, powinny zostać wykluczone z analizy wyniku badania. Jeżeli upadkowość przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, upadkowość zwierząt rodzicielskich powinna zostać oznaczona jako skutek narażenia na działanie badanej substancji chemicznej, a kontrpróby nie powinny zostać wykluczone z analizy wyniku badania.

Podsumowując, jeżeli do wyrażenia wpływu wykorzystuje się LOEC i NOEC lub EC_x, zalecane jest obliczenie wpływu na rozrodczość przy użyciu obu wyżej wspomnianych zmiennych zależnych, tj.

([1]) Upadkowość przypadkowa: upadkowość niezwiązana z substancją chemiczną, spowodowana zdarzeniem przypadkowym (tj. znaną przyczyną).

([2]) Upadkowość niezamierzona: upadkowość niezwiązana z substancją chemiczną, spowodowana nieznaną przyczyną.

▼M7

— całkowitej liczby żyjącego potomstwa spłodzonego przez zwierzę rodzicielskie, które nie padło w sposób przypadkowy lub niezamierzony w trakcie badania, oraz

— liczby żyjącego potomstwa spłodzonego przez zwierzę rodzicielskie, które przeżyło badanie,

a następnie wykorzystanie jako wynik końcowy najniższej wartości NOEC i LOEC lub EC_x obliczonej przy użyciu jednej z tych dwóch zmiennych zależnych.

Przed zastosowaniem analiz statystycznych, np. procedur ANOVA, porównania grup badanych z grupami kontrolnymi w ramach testu t-Studenta, testu Dunnetta, testu Williamsa lub regresyjnego testu Jonckheere'a-Terpstry, zalecane jest rozważenie przekształcenia danych, jeśli jest to konieczne do spełnienia wymogów określonego testu statystycznego. Jako alternatywne metody nieparametryczne można rozważyć test Dunna lub test Manna-Whitneya. Przedziały ufności wynoszące 95 % oblicza się w odniesieniu do średnich z poszczególnych grup badanych.

Liczba zwierząt rodzicielskich, które przeżyły badanie, w próbach kontrolnych niepoddawanych działaniu substancji stanowi kryterium ważności i powinna być udokumentowana i odnotowana. W sprawozdaniu końcowym należy również przedstawić wszelkie inne szkodliwe skutki, np. nietypowe zachowanie, oraz ustalenia istotne pod względem toksykologicznym.

ECx

Wartości ECx, w tym powiązane z nimi górne i dolne granice ufności, oblicza się przy użyciu odpowiednich metod statystycznych (np. funkcji logistycznej lub Weibulla, zmodyfikowanej metody Spearmana-Kärbera lub prostej interpolacji). Aby obliczyć EC10, EC_{50} lub dowolną inną wartość ECx, należy zastosować analizę regresji w odniesieniu do kompletnego zbioru danych.

NOEC/LOEC

Jeżeli celem analizy statystycznej ma być ustalenie NOEC/LOEC, należy zastosować odpowiednie metody statystyczne zgodnie z wytycznymi OECD nr 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application” (4). Ogólnie rzecz biorąc, niekorzystne skutki podania badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną bada się, stosując test jednostronnej hipotezy na poziomie $p \leq 0{,}05$.

Rozkład normalny i jednorodność wariancji można zbadać za pomocą odpowiedniego testu statystycznego, np. za pomocą odpowiednio testu Shapiro-Wilka i testu Levene'a ($p \leq 0{,}05$). Można wykonać jednokierunkową analizę ANOVA i kolejne testy wielokrotnego porównywania. Testy wielokrotnego porównywania (np. test Dunnetta) lub testy regresyjne (np. test Williamsa lub regresyjny test Jonckheere'a-Terpstry) mogą być stosowane w celu obliczenia, czy istnieją znaczące różnice ($p \leq 0{,}05$) między próbami kontrolnymi i różnymi stężeniami badanej substancji chemicznej (wybór zalecanego testu zgodnie z wytycznymi OECD nr 54 (4)). W przeciwnym razie NOEC i LOEC można określić za pomocą metod nieparametrycznych (np. za pomocą testu Bonferroniego-Wilcoxona zgodnie z testem trendu Holma lub Jonckheere'a-Terpstry).

Badanie graniczne

Jeżeli przeprowadzono badanie graniczne (porównanie próby kontrolnej z jedną tylko próbą poddaną działaniu substancji chemicznej) i spełnione są warunki wstępne dotyczące parametrycznych procedur badawczych (normalność, jednorodność), odpowiedzi metryczne można ocenić za pomocą testu t-Studenta. Jeżeli warunki te nie zostały spełnione, można zastosować test t-Studenta (np. test Welcha) dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, np. test Manna-Whitneya-Wilcoxona.

Aby określić znaczące różnice między próbami kontrolnymi (próbą kontrolną i próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem lub środkiem dyspergującym), można wykonać badanie kontrprób każdej próby kontrolnej zgodnie z opisem dotyczącym badania granicznego. Jeżeli w wyniku tych badań nie zostaną wykryte znaczące różnice, wszystkie próby kontrolne i kontrpróby kontrolne z rozpuszczalnikiem mogą być połączone. W przeciwnym wypadku wszystkie próby poddawane działaniu substancji chemicznej należy porównać z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem.

▼M7

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania zawiera następujące informacje.

Badana substancja chemiczna:

— stan skupienia i istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, w tym czystość.

Gatunek doświadczalny:

— klon (czy był typowany genetycznie), dostawca lub źródło (jeśli jest znane) i stosowane warunki hodowli. Jeśli użyto innego gatunku niż *Daphnia magna*, powinno to być odnotowane i uzasadnione.

Warunki badania:

— stosowana procedura badawcza (np. półstatyczna lub przepływowa, objętość, obciążenie pod względem ilości *Daphnia* na litr);

— fotoperiod i światłość;

— projekt badania (np. liczba kontrprób, liczba zwierząt rodzicielskich na kontrpróbę);

— szczegółowe informacje na temat zastosowanego podłoża;

— jeśli stosowano, dodatki materiałów organicznych, w tym ich skład, źródło, metoda przygotowania, TOC/COD preparatów podstawowych, oszacowanie wynikłego TOC/COD w ośrodku użytym w badaniu;

— szczegółowe informacje o karmieniu, w tym o ilości pokarmu (w mg C na *Daphnia* dziennie) i harmonogramie karmienia (np. typ pokarmu, w tym w odniesieniu do glonów właściwa nazwa (gatunek) i szczep, jeśli jest znany, oraz warunki hodowli);

— metoda przygotowania roztworów podstawowych i częstotliwość ich wymiany (jeżeli użyto rozpuszczalnika lub środka dyspergującego, należy to odnotować i podać jego stężenie).

Wyniki:

— wyniki ze wszystkich wstępnych badań stabilności badanej substancji chemicznej;

— nominalne badane stężenia i wyniki wszystkich analiz ustalających stężenie badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych (zob. przykładowe arkusze danych w dodatku 5); należy również podać sprawność odzyskową metody i granicę oznaczalności;

— jakość wody w naczyniach badawczych (tj. pH, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, TOC lub COD oraz twardość w stosownym przypadku) (zob. przykładowy arkusz danych w dodatku 4);

— pełny zapis płodzenia żyjącego potomstwa przez każde zwierzę rodzicielskie podczas badania (zob. przykładowy arkusz danych w dodatku 4);

— liczba padłych zwierząt rodzicielskich wraz z datą zgonu (zob. przykładowy arkusz danych w dodatku 4);

— współczynnik zmienności dla zdolności rozrodczej w grupie kontrolnej (oparty na całkowitej liczbie żyjącego potomstwa na zwierzę rodzicielskie żyjące na koniec badania);

— wykres całkowitej liczby żyjącego potomstwa spłodzonego przez zwierzę rodzicielskie w każdej kontrpróbce, z wyłączeniem wszelkich zwierząt rodzicielskich, które padły w sposób przypadkowy lub niezamierzony w trakcie badania, w stosunku do stężenia badanej substancji chemicznej;

▼M7

— w stosownych przypadkach wykres całkowitej liczby żyjącego potomstwa spłodzonego przez zwierzę rodzicielskie, które przeżyło badanie, w każdej kontrpróbce w stosunku do stężenia badanej substancji chemicznej;

— w stosownych przypadkach najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), w odniesieniu do rozrodczości, w tym opis zastosowanych procedur statystycznych i wskazanie spodziewanych rozmiarów wykrywanych skutków (w celu uzyskania tego wskaźnika można przed rozpoczęciem doświadczenia przeprowadzić analizę mocy wpływu), oraz najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), w odniesieniu do rozrodczości; informacje o zmiennej zależnej, którą wykorzystano do obliczenia wartości LOEC i NOEC (całkowita liczba żyjącego potomstwa na organizm rodzicielski, który nie padł w sposób przypadkowy lub niezamierzony w trakcie badania, lub całkowita liczba żyjącego potomstwa na organizm rodzicielski, który przeżył badanie); w stosownych przypadkach należy także przedstawić LOEC/NOEC w odniesieniu do upadkowości zwierząt rodzicielskich;

— w stosownych przypadkach EC_x w odniesieniu do rozrodczości oraz przedziały ufności (np. 90 % lub 95 %) i wykres dopasowanego modelu wykorzystanego do obliczeń, nachylenie krzywej stężenie-efekt i jego błąd standardowy;

— inne obserwowane skutki biologiczne lub pomiary: przedstawienie wszystkich innych skutków biologicznych zaobserwowanych lub pomierzonych (np. wzrost zwierząt rodzicielskich) wraz z właściwym uzasadnieniem;

— wytłumaczenie wszelkich odchyleń od metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, Zjednoczone Królestwo, 20–21 marca 1993 r.

(2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 6. OECD, Paryż.

(3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 88. OECD, Paryż.

(4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny nr 54. OECD, Paryż.

(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, s. 257–265.

(6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, s. 25–33.

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Wydanie piąte. EPA/821/R-02/012. Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych, Urząd ds. Wody, Waszyngton, D.C. 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, s. 775–782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. W: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, t. 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. W: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Kopenhaga 1988. (H. Løkke, H. Tyle i F. Bro-Rasmussen. red.) s. 144–148.

▼M7

(11) Parkhurst, B.R., J.L Forte, oraz G.P. Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: s. 1–8.

(12) Cowgill, U.M. i Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120 (2): s. 185–196.

(13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 23. OECD, Paryż.

(14) Sims, I.R., S. Watson. i D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, s. 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, s. 459–466.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICJE

Dla celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Upadkowość przypadkowa: upadkowość niezwiązana z substancją chemiczną, spowodowana zdarzeniem przypadkowym (tj. znaną przyczyną).

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

ECx: stężenie badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w wodzie powodujące spadek rozrodczości *Daphnia* o x % w określonym okresie narażenia.

Upadkowość niezamierzona: upadkowość niezwiązana z substancją chemiczną, spowodowana nieznaną przyczyną.

Wewnętrzny wskaźnik przyrostu populacji: miara przyrostu populacji, która łączy zdolność rozrodczą i upadkowość swoistą dla wieku (1) (2) (3). W populacji w stanie równowagi będzie równy zero. W przypadku rosnących populacji wskaźnik ten będzie dodatni, a dla malejących populacji – ujemny. Jest oczywiste, że ten drugi wskaźnik jest niezrównoważony i ostatecznie doprowadzi do wymarcia danej populacji.

Granica wykrywalności: najniższe stężenie, które może być wykryte, ale nie może być ilościowo oznaczone.

Granica oznaczalności: najniższe stężenie, które można zmierzyć ilościowo.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC): najniższe badane stężenie substancji chemicznej, przy którym obserwuje się statystycznie istotny wpływ tej substancji na rozrodczość i upadkowość zwierząt rodzicielskich (przy $p < 0,05$) w porównaniu z próbą kontrolną w określonym okresie narażenia. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC powinny wywierać szkodliwy skutek równy skutkom lub większy niż skutki obserwowane przy LOEC. W przypadku gdy oba warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC).

Upadkowość: zwierzę jest rejestrowane jako martwe, gdy jest nieruchome, tj. gdy nie jest w stanie pływać lub nie jest obserwowany ruch przydatków lub odwłoka, w ciągu 15 sekund po łagodnym poruszeniu pojemnika badawczego. (Jeśli stosowana jest inna definicja, należy to zgłosić, podając jednocześnie odniesienie do niej).

Najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC): badane stężenie bezpośrednio poniżej LOEC, które nie ma statystycznie istotnego wpływu ($p < 0,05$) w porównaniu z próbą kontrolną w określonym okresie narażenia.

Potomstwo: młode *Daphnia* spłodzone przez zwierzęta rodzicielskie w trakcie badania.

Zwierzęta rodzicielskie: samice *Daphnia* obecne na początku badania, których zdolność rozrodcza jest przedmiotem badania.

Zdolność rozrodcza: liczby żyjącego potomstwa spłodzonego przez zwierzęta rodzicielskie w okresie badania.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Bibliografia

1) Wilson, E.O. i 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, Nowy Jork, s. 532.

3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. i Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, s. 1156–1166.

▼M7

Dodatek 2

PRZYGOTOWANIE W PEŁNI ZDEFINIOWANYCH OŚRODKÓW ELENDTA M7 I M4

Aklimatyzacja do ośrodków Elendta M7 i M4

Niektóre laboratoria doświadczyły trudności w bezpośrednim przeniesieniu *Daphnia* do ośrodków M4 (1) i M7. Osiągnięto jednak pewne pomyślne wyniki, stosując aklimatyzację stopniową, tj. przenosząc rozwielitki z własnego ośrodka do 30-procentowego roztworu Elendta, następnie do 60-procentowego roztworu Elendta, a później do 100-procentowego roztworu Elendta. Konieczne może być stosowanie okresu aklimatyzacji trwającego nawet miesiąc.

Przygotowanie

Pierwiastki śladowe

Najpierw przygotowuje się osobne roztwory podstawowe (I) poszczególnych pierwiastków śladowych w wodzie o odpowiedniej czystości, np. dejonizowanej, destylowanej lub poddanej odwróconej osmozie. Z tych roztworów podstawowych (I) przygotowywany jest drugi pojedynczy roztwór podstawowy (II), który zawiera wszystkie elementy śladowe (roztwór łączony), tj.:

Roztwory podstawowe (I) (pojedyncza substancja)	Ilość dodana do wody	Stężenie (odnoszące się do ośrodka M4)	W celu przygotowania łączonego roztworu podstawowego II dodać następujące ilości roztworu podstawowego I do wody	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000-krotne	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000-krotne	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-krotne	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-krotne	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000-krotne	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-krotne	1,0	0,25
$Mo\ Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000-krotne	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000-krotne	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-krotne	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000-krotne	1,0	1,0
KI	65	20 000-krotne	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000-krotne	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-krotne	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000-krotne	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000-krotne	—	—
Zarówno roztwór Na_2EDTA, jak i roztwór $FeSO_4$ są przygotowywane oddzielnie, zlewane razem i niezwłocznie umieszczane w autoklawie. Daje to:				
roztwór Fe-EDTA		1 000-krotne	20,0	5,0

▼**M7**

Ośrodki M4 i M7

Ośrodki M4 i M7 są przygotowane przy użyciu roztworu podstawowego II, makroskładników odżywczych i witamin w następujący sposób:

	Ilość dodana do wody	Stężenie (odnoszące się do ośrodka M4)	Ilość roztworu podstawowego dodanego w celu przygotowania ośrodka	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Roztwór podstawowy II (połączone pierwiastki śladowe)		20-krotne	50	50
Roztwory podstawowe makroskładników odżywczych (pojedyncze substancje)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000-krotne	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000-krotne	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-krotne	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-krotne	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000-krotne	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-krotne	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-krotne	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-krotne	0,1	0,1
Łączony roztwór podstawowy witamin	—	10 000-krotne	0,1	0,1

Łączony roztwór podstawowy witamin przygotowuje się przez dodanie 3 witamin do 1 litra wody, jak przedstawiono poniżej:

	mg/l			
Chlorowodorek tiaminy	750	10 000-krotne		
Cyjanokobalamina (B12)	10	10 000-krotne		
Biotyna	7,5	10 000-krotne		

Łączony roztwór podstawowy witamin przechowuje się zamrożony w małych podwielokrotnościach. Witaminy są dodawane do ośrodka na krótko przed użyciem.

Uwaga: Aby uniknąć wytrącania się soli przy przygotowaniu kompletnego ośrodka, należy dodać podwielokrotności roztworów podstawowych do około 500–800 ml dejonizowanej wody, a następnie dopełnić do 1 litra.

Uwaga: Pierwszą publikację o ośrodku M4 można znaleźć w: Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, s. 25–33.

▼M7

Dodatek 3

ANALIZA CAŁKOWITEGO WĘGLA ORGANICZNEGO (TOC) I WYKONANIE NOMOGRAMU ZAWARTOŚCI TOC W POKARMIE GLONOWYM

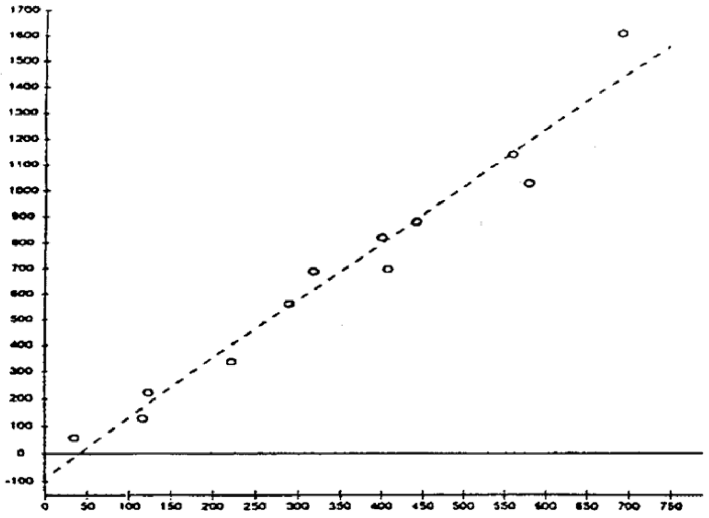
Należy uwzględnić, że zawartość węgla w pokarmie glonowym zwykle nie będzie mierzona bezpośrednio, ale z korelacji (tj. nomogramów) z pomiarami zastępczymi, takimi jak liczba komórek glonów lub absorbancja światła.

TOC powinien być mierzony raczej wysokotemperaturowym utlenieniem niż ultrafioletem lub metodą nadsiarczanową (zob. wskazówki w: *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands* 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, Londyn WC1V 6HB).

Na potrzeby wykonania nomogramu glony należy oddzielić od pożywki przez wirowanie, a następnie ponowne zawieszenie w wodzie destylowanej. Należy trzykrotnie zmierzyć parametr zastępczy i stężenie TOC w każdej próbce. Ślepe próby z wodą destylowaną należy przeanalizować i odjąć stężenie TOC od stężenia TOC w próbce glonów.

Nomogramy powinny być liniowe ponad wymagany zakres stężenia węgla. Przykłady przedstawiono poniżej.

Uwaga: tych nomogramów nie należy używać do przeliczania; istotne jest, aby laboratoria przygotowały swoje własne nomogramy.



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

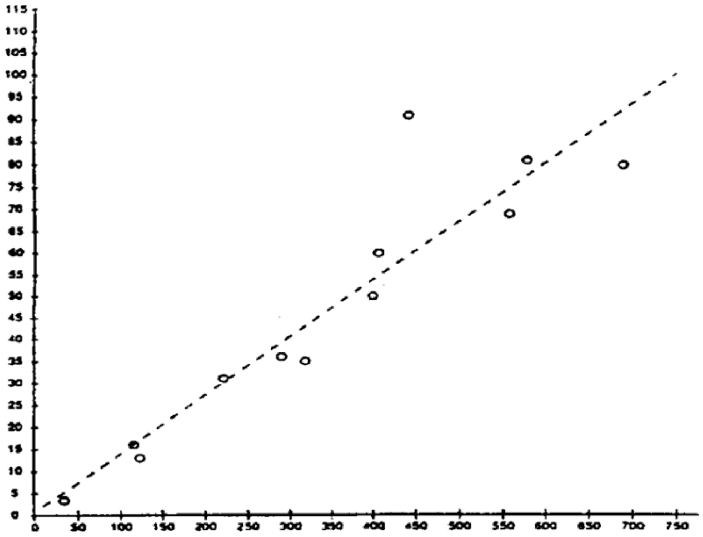
Regresja w mg/l suchej masy na mg C/1. Dane ze stężonych zawiesin półciągłej partii wsadowej komórek hodowli, ponownie zawieszonych w wodzie destylowanej.

oś x: mg C/1 stężonego pokarmu glonowego

oś y: sucha masa stężonego pokarmu glonowego w mg/1

Współczynnik korekty -0,980

▼**M7**



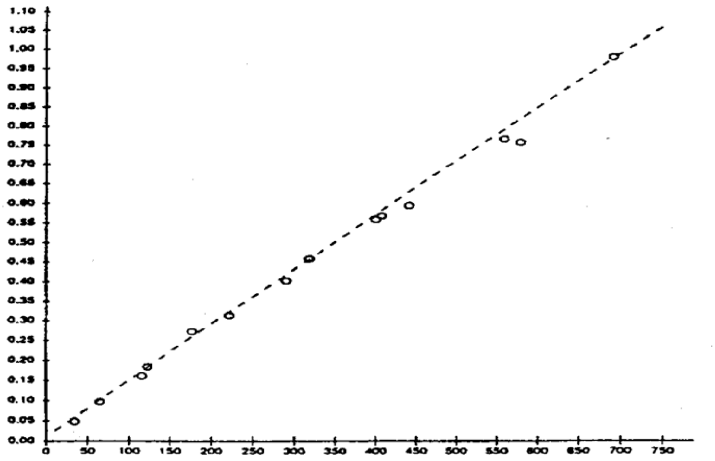
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regresja liczby komórek na mg C/1. Dane ze stężonych zawiesin półciągłej partii wsadowej komórek hodowli, ponownie zawieszonych w wodzie destylowanej.

oś x: mg C/1 stężonego pokarmu glonowego

oś y: Liczba komórek/1 stężonego pokarmu glonowego

Współczynnik korekty – 0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regresja absorbancji na mg C/1 (1 cm długości ścieżki). Dane ze stężonych zawiesin półciągłej partii wsadowej komórek hodowli, ponownie zawieszonych w wodzie destylowanej.

oś x: mg C/1 stężonego pokarmu glonowego

oś y: Absorbancja przy 440 nm 1/10 rozcieńczenia stężonego pokarmu glonowego

Współczynnik korekty – 0,998

▼M7

Dodatek 4

PRZYKŁADOWY ARKUSZ DANYCH NA POTRZEBY REJESTROWANIA WYMIANY OŚRODKA, DANYCH Z MONITOROWANIA STANU FIZYKOCHEMICZNEGO, KARMIENIA, ROZRODCZOŚCI DAPHNIA I UPADKOWOŚCI ZWIERZĄT RODZICIELSKICH

Doświadczenie nr:	Data rozpoczęcia:						Klon:			Ośrodek:				Typ pokarmu:				Badana substancja chemiczna:					Stężenie nominalne:	
Dzień	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Wymiana ośrodka (zaznaczyć)																								
pH (*)																							nowe	
																							stare	
O_2 (mg/l) (*)																							nowe	
																							stare	
Temperatura (°C) (*)																							nowe	
																							stare	
Dostarczony pokarm (zaznaczyć)																								
Liczba żywego potomstwa (**)																								Ogółem
Naczynie 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — PL — 16.10.2019 — 008.001 — 1825

▼M7

Doświadczenie nr:		Data rozpoczęcia:					Klon:			Ośrodek:				Typ pokarmu:				Badana substancja chemiczna:					Stężenie nominalne:	
Dzień	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																								
																							Ogółem	
Zbiorcza upadkowość zwierząt rodzicielskich (***)																								

(*) Należy wskazać, który pojemnik był użyty w doświadczeniu.
(**) Należy odnotować przerwane wylęgi jako „AB” w stosownym okienku.
(***) Należy odnotować upadkowość zwierząt rodzicielskich jako „M” w stosownym okienku.

▼**M7**

Dodatek 5

PRZYKŁADOWY ARKUSZ DANYCH NA POTRZEBY REJESTROWANIA WYNIKÓW ANALIZY CHEMICZNEJ

a) **Zmierzone stężenia**

Stężenie nominalne	Próba tydzień 1.		Próba tydzień 2.		Próba tydzień 3.	
	Świeże	Stare	Świeże	Stare	Świeże	Stare

b) **Zmierzone stężenia jako procent stężenia nominalnego**

Stężenie nominalne	Próba tydzień 1.		Próba tydzień 2.		Próba tydzień 3.	
	Świeże	Stare	Świeże	Stare	Świeże	Stare

▼M7

Dodatek 6

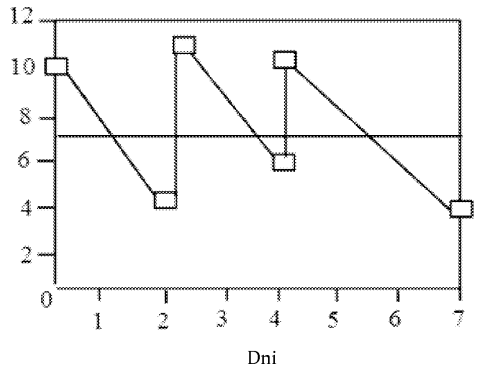
OBLICZANIE ŚREDNIEJ WAŻONEJ W CZASIE

Średnia ważona w czasie

Biorąc pod uwagę fakt, że stężenie badanej substancji chemicznej może z czasem maleć między poszczególnymi wymianami ośrodka, konieczne jest rozważenie, które stężenie należy wybrać jako reprezentatywne dla zakresu stężeń doświadczanych przez osobniki rodzicielskie *Daphnia*. Wybór powinien być oparty na zarówno względach biologicznych, jak i statystycznych. Na przykład, jeśli sądzi się, że największy wpływ na rozrodczość ma szczytowe stężenie doświadczane, należy zastosować maksymalne stężenie. Jeżeli jednak za ważniejszy uważa się skumulowany lub długotrwały wpływ toksycznej substancji chemicznej, bardziej właściwe jest średnie stężenie. W takim przypadku odpowiednim średnim stężeniem, które należy zastosować, jest średnie stężenie ważone w czasie, ponieważ uwzględnia zróżnicowanie chwilowego stężenia z czasem.

Wykres 1

Przykład średniej ważonej w czasie



Na wykresie 1 przedstawiono przykład (uproszczonego) badania trwającego siedem dni z wymianą ośrodka w dniach 0, 2 i 4.

— Cienka zygzakowata linia przedstawia stężenie w każdym punkcie czasu. Zakłada się, że spadek stężenia przebiega zgodnie z procesem rozpadu wykładniczego.

— Sześć wykreślonych punktów przedstawia zaobserwowane stężenia zmierzone na początku i na końcu każdego okresu wymiany.

— Gruba linia ciągła pokazuje położenie średniej ważonej czasem.

Średnia ważona w czasie jest obliczana tak, aby pole pod średnią ważoną w czasie było równe polu pod krzywą stężenia. Obliczenia w odniesieniu do powyższego przykładu przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Obliczanie średniej ważonej w czasie

Wymiana Liczba	Dni	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Pole
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

Wymiana Liczba	Dni	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Pole
Suma dni:	7				Całkowite pole:	50,092
					Średnia ważona w czasie:	7,156

Dni to liczba dni w okresie wymiany.

Conc 0 jest zmierzonym stężeniem na początku każdego okresu wymiany.

Conc 1 jest zmierzonym stężeniem na końcu każdego okresu wymiany.

Ln(Conc 0) jest naturalnym logarytmem Conc 0.

Ln(Conc 1) jest naturalnym logarytmem Conc 1.

Pole jest polem pod krzywą wykładniczą dla każdego okresu wymiany. Średnią ważoną w czasie oblicza się w następujący sposób:

$$Area = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Day$$

Średnia ważona w czasie jest *całkowitym polem* podzielonym przez *sumę dni*.

Oczywiście w odniesieniu do badania rozrodczości *Daphnia* tabelę należy rozszerzyć, aby obejmowała 21 dni.

Oczywiste jest, że gdy przeprowadza się obserwacje tylko na początku i na końcu każdego okresu wymiany, nie jest możliwe potwierdzenie, że proces rozpadu rzeczywiście przebiega wykładniczo. Odmienna krzywa dawałaby odmienne wyliczenie *pola*. Proces rozpadu wykładniczego nie jest jednak nieprawdopodobny; jest prawdopodobnie najlepszą krzywą do zastosowania w przypadku braku innych informacji.

Należy jednak zachować ostrożność, jeśli analiza chemiczna na koniec okresu wymiany nie wykryje żadnej substancji chemicznej. Jeżeli nie jest możliwe oszacowanie, jak szybko substancja chemiczna zniknęła z roztworu, niemożliwe jest uzyskanie realistycznego pola pod krzywą, a zatem niemożliwe jest uzyskanie wiarygodnej średniej ważonej w czasie.

▼M7

Dodatek 7

WYTYCZNE DOTYCZĄCE OKREŚLANIA PŁCI NOWO WYKLUTYCH OSOBNIKÓW

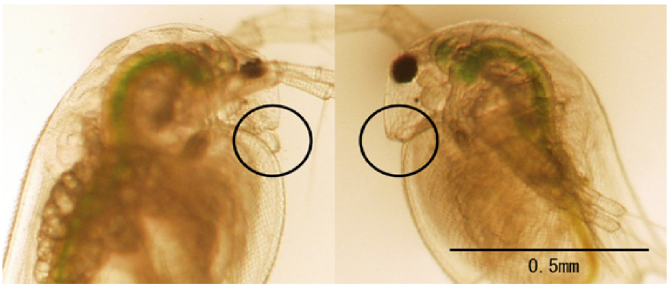
Do rodzenia się samców wśród osobników nowo wyklutych może dochodzić w zmieniających się warunkach otoczenia, takich jak skrócenie fotoperiodu, zmiana temperatury, malejące stężenie pokarmu i rosnąca gęstość populacji (Hobaek i Larson, 1990; Kleiven *et al.*, 1992). Rodzenie się samców jest także znaną reakcją na pewne regulatory wzrostu owadów (Oda *et al.*, 2005). W warunkach, w których drażniące substancje chemiczne wywołują spadek liczby zdolnego do rozmnażania się potomstwa samic rozmnażających się partenogenetycznie, można spodziewać się wzrostu liczby samców (OECD, 2008). Na podstawie dostępnych informacji nie jest możliwe przewidzenie, które z proporcji płci lub punktów końcowych rozrodczości będą bardziej czułe; istnieją jednak przesłanki (referencyjne „sprawozdanie z weryfikacji", część 1), że wzrost liczby samców może być mniej czułym wskaźnikiem niż spadek liczby potomstwa. Ponieważ głównym celem metody badawczej jest oszacowanie liczby spłodzonego potomstwa, obserwacja pojawiania się samców jest nieobowiązkowa. Jeżeli ten fakultatywny punkt końcowy jest oceniany w ramach badania, należy zastosować dodatkowe kryterium ważności badania, zgodnie z którym w grupach kontrolnych powinno występować nie więcej niż 5 % samców.

Najpraktyczniejszym i najłatwiejszym sposobem rozróżniania płci rozwielitek jest wykorzystanie ich cech fenotypowych, ponieważ samce i samice są genetycznie identyczne, a ich płeć jest determinowana czynnikami środowiskowymi. Samce i samice różnią się długością ciała oraz morfologią pierwszej pary czułków, które u samców są dłuższe niż u samic (rys. 1). Różnicę tę można zaobserwować od razu po wykluciu, chociaż w miarę dojrzewania pojawiają się inne drugorzędowe cechy płciowe (np. zob. rys. 2 w: Olmstead i LeBlanc, 2000).

Aby przeprowadzić obserwację płci morfologicznej, należy nowo wyklute osobniki spłodzone przez każde zwierzę doświadczalne przenieść pipetą na szalkę Petriego z ośrodkiem użytym do badania. Ilość ośrodka powinna być minimalna, co ma na celu ograniczenie ruchu zwierząt. Obserwację pierwszej pary czułków można przeprowadzić pod mikroskopem stereoskopowym (×10–60).

Rys. 1

24-godzinne samiec (po lewej) i samica (po prawej) *D. magna*. Samców można odróżnić od samic na podstawie długości ciała oraz morfologii pierwszej pary czułków, zaznaczonej okręgami (Tatarazako *et al.*, 2004).



BIBLIOGRAFIA

Hobaek A i 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, s. 197–206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., i 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. Seria OECD dotycząca badań i oceny nr 88. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż.

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. i Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, s. 439–449.

▼B

C.21. MIKROORGANIZMY GLEBOWE: BADANIA PRZEMIAN AZOTU

1. METODA

Ta metoda jest równoważna OECD TG 216 (2000).

1.1 WPROWADZENIE

Ta metoda badawcza opisuje laboratoryjną metodę opracowaną do badania długookresowych skutków jednorazowego wystawienia na działanie środków chemicznych dla aktywności mikroorganizmów glebowych związanej z przemianami azotu. To badanie jest oparte głównie na zaleceniach Europejskiej i Śródziemnomorskiej Organizacji Ochrony Roślin (1). Jednakże inne wytyczne, w tym wytyczne German Biologische Bundesanstalt (2), Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (3) SETAC (4) i Międzynarodowej Organizacji Normalizacyjnej (5), także zostały wzięte pod uwagę. W czasie warsztatów OECD na temat Selekcji Gleb/Osadów, mających miejsce w Belgirate we Włoszech w 1995 (6), ustalono ilość i rodzaj gleb stosowanych w tym badaniu. Zalecenia w sprawie pobierania, przenoszenia i przechowywania próbek gleby są oparte na wytycznych metodycznych według ISO (7) i zaleceniach z warsztatów w Belgirate. W ocenie i interpretacji toksycznych właściwości badanej substancji może być wymagane określenie skutków działania dla aktywności mikrobiologicznej, np. jeżeli są wymagane dane na temat potencjalnych efektów ubocznych działania środków ochrony upraw na mikroflorę glebową lub jeżeli spodziewane jest wystawienie mikroorganizmów na działanie związków chemicznych innych niż środki ochrony upraw. Badanie przemiany azotu jest prowadzone w celu określenia wpływu działania takich związków chemicznych na mikroflorę. Jeżeli badane są substancje agrochemiczne (np. środki ochrony upraw, nawozy, związki chemiczne stosowane w leśnictwie), to są prowadzone zarówno badania przemiany azotu, jak i węgla. Jeżeli badane są substancje nieagrochemiczne, wystarczające jest badanie przemian azotu. Jednakże, jeżeli wartości EC_{50} w badaniach przemiany azotu znajdą się w zakresie, w którym taki związek chemiczny uznaje się za dostępny w handlu inhibitor nitryfikacji (np. nitropiryna), można przeprowadzić badania przemian azotu w celu uzyskania dodatkowych informacji.

Gleby składają się ze składników ożywionych i nieożywionych, które występują w złożonych i heterogenicznych mieszaninach. Mikroorganizmy odgrywają istotną rolę w rozkładzie i przemianie materii organicznej w żyznych glebach, gdzie wiele gatunków przyczynia się do różnych aspektów żyzności gleby. Jakikolwiek długookresowy wpływ na procesy biochemiczne może potencjalnie zakłócić obieg substancji biogennych, a to może zmienić żyzność gleb. Przemiany węgla i azotu występują we wszystkich żyznych glebach. Pomimo że biocenozy bakteryjne różnią się w poszczególnych rodzajach gleb, szlaki przemian są w zasadzie takie same.

Ta opisana metoda badawcza jest przeznaczona do wykrywania długookresowych niepomyślnych skutków działania substancji na procesy przemiany azotu w natlenionych powierzchniowych warstwach gleb. Metoda badawcza pozwala także na określenie skutków działania substancji na przemiany węgla przez mikroflorę glebową. Tworzenie azotanów ma miejsce po degradacji wiązań węgiel-azot. Z tego powodu, jeżeli zostaną stwierdzone jednakowe tempa produkcji azotu w glebie badanej i kontrolnej, istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że główne szlaki degradacji węgla są nienaruszone i funkcjonalne. Substrat wybrany do badań (sproszkowana mączka z lucerny) ma korzystny stosunek węgla do azotu (na ogół pomiędzy 12/1 a 16/1). Z tego powodu ograniczony zostaje deficyt węgla podczas badania, a jeżeli w wyniku działania związku chemicznego zostaną uszkodzone biocenozy bakteryjne, mogą się odtworzyć w ciągu 100 dni.

▼B

Badania, na podstawie których została opracowana ta metoda badawcza, były na początku przeznaczone dla substancji, dla których można było przewidzieć ich ilość będącą w kontakcie z glebą. Tak się dzieje, na przykład, w przypadku środków ochrony upraw, gdzie znana jest ich ilość podawana w terenie. Dla substancji agrochemicznych wystarczające jest badanie dwóch dawek odpowiadających ilości podanej lub przewidywanej. Substancje agrochemiczne mogą być badane jako aktywne dodatki (a.i.) lub jako gotowe produkty. Jednakże badanie nie jest ograniczone do substancji agrochemicznych. Zmieniając zarówno ilości substancji badanej podanej do gleby, jak i sposób interpretacji wyników, badania mogą być stosowane do substancji chemicznych, których przewidywana ilość przechodząca do gleby jest nieznana. Wobec tego dla substancji chemicznych innych niż agrochemiczne określa się wpływ różnych stężeń na przemiany azotu. Wyniki tych badań są wykorzystywane do przygotowania krzywej zależności dawka-odpowiedź i obliczenia wartości EC_x, gdzie x zdefiniowano jako % oddziaływania.

1.2. DEFINICJE

Przemiany azotu: to ostateczna degradacja materii organicznej zawierającej azot, w wyniku działania mikroorganizmów, poprzez procesy amonifikacji i nitryfikacji, do odpowiednich nieorganicznych produktów końcowych azotanowych.

EC_x (stężenie efektywne): to stężenie substancji badanej w glebie, które powoduje x procentową inhibicję przemian azotu do azotanu.

EC_{50} (mediana stężenia efektywnego): stężenie substancji w glebie, które powoduje 50-procentową (50 %) inhibicję przemian azotu do azotanu.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Przesiana gleba jest wzbogacona sproszkowaną mączką roślinną i albo poddawana działaniu badanej substancji, albo pozostawiona nienaruszona (próbka kontrolna). Jeżeli badane są substancje agrochemiczne, zaleca się stosowanie przynajmniej dwóch stężeń i powinny one być wybrane w odniesieniu do najwyższego stężenia, jakie może występować w terenie. Po 0, 7, 14 dniach i po 28 dniach inkubacji próbki gleby badanej i kontrolnej są ekstrahowane odpowiednim rozpuszczalnikiem i oznaczane są ilości azotanów w ekstraktach. Tempo wytwarzania azotanów w próbce badanej jest porównywane z tempem w próbce kontrolnej i obliczane jest odchylenie procentowe między próbką badaną a kontrolną. Wszystkie badania są prowadzone przynajmniej przez 28 dni. Jeżeli 28 dnia różnice pomiędzy glebami badanymi a kontrolnymi będą równe lub większe niż 25 %, badania są kontynuowane przez maksymalnie 100 dni. Jeżeli badane są substancje nieagrochemiczne, do próbek gleby dodawana jest seria stężeń badanej substancji i mierzone są ilości wytworzonych azotanów w próbce badanej i kontrolnej po 28 dniach inkubacji. Wyniki badań z wieloma stężeniami są analizowane przy użyciu modelu regresyjnego i obliczane są wartości EC_x (to jest EC_{50}, EC_{25} i/lub EC_{10}). Zob. definicje.

1.5. WAŻNOŚĆ BADANIA

Oceny wyników badań substancji agrochemicznych są oparte na stosunkowo niewielkich różnicach (średnia wartość ± 25 %) pomiędzy stężeniem azotanów w kontrolnych i badanych próbkach gleby, więc duże różnice próbek kontrolnych mogą prowadzić do fałszywych wyników. Z tego powodu odchylenia pomiędzy powtórzeniami próbek kontrolnych powinny być mniejsze niż ± 15 %.

▼B

1.6. OPIS METODY BADANIA

1.6.1. **Aparatura**

Stosowane są pojemniki z materiałów chemicznie obojętnych. Powinny one mieć odpowiednią pojemność zgodnie z procedurą stosowaną do inkubacji gleb, to jest inkubacji w masie lub jako serii pojedynczych próbek gleby (zob. sekcja 1.7.1.2). Powinno się zwrócić uwagę na minimalizację utraty wody i umożliwienie wymiany gazów podczas badania (np. pojemniki do badań mogą być przykryte perforowaną folią polietylenową). Jeżeli badane są substancje lotne, powinno się stosować pojemniki umożliwiające uszczelnienie i gazoszczelne. Powinny być takiej wielkości, aby około jednej czwartej ich objętości było wypełnione próbką gleby.

Stosowane jest następujące standardowe wyposażenie laboratoryjne:

— mieszadło: mechaniczna wytrząsarka lub urządzenie podobne,

— wirówka (pojemność 3 000g) lub filtr (stosując papier bezazotanowy),

— instrument o odpowiedniej czułości i powtarzalności do analizy azotanów.

1.6.2. **Wybór i ilość rodzajów gleb**

Stosowany jest jeden rodzaj gleb. Zalecanymi własnościami gleby są:

— zawartość piasku: nie mniej niż 50 % i nie więcej niż 75 %,

— pH: 5,5–7,5,

— zawartość węgla organicznego: 0,5–1,5 %,

— powinna zostać zmierzona mikrobiologiczna biomasa (8)(9) i jej zawartość węgla powinna wynosić przynajmniej 1 % całkowitej masy węgla organicznego w glebie.

Przeważnie, gleby o takich własnościach stanowią najgorszy przypadek, ponieważ adsorpcja badanej substancji chemicznej jest minimalna, a jej dostępność dla mikroflory maksymalna. Wynika z tego, że badania innych gleb są na ogół niepotrzebne. Jednakże w pewnych okolicznościach, to jest gdy przewiduje się, że substancja badana będzie stosowana głównie w określonych glebach, takich jak kwaśne gleby leśne lub dla substancji chemicznych z ładunkiem elektrostatycznym, może być konieczne zastosowanie dodatkowych rodzajów gleb.

▼B

1.6.3. **Pobieranie i przechowywanie próbek gleby**

1.6.3.1. *Pobieranie*

Powinny być dostępne szczegółowe informacje na temat historii obszaru, z jakiego została pobrana badana próbka gleby. Szczegółowe informacje powinny obejmować dokładną lokalizację, szatę roślinną, daty poddania działaniu środków ochrony upraw, podanie nawozów organicznych lub nieorganicznych, dodanie materiałów biologicznych lub przypadkowe zanieczyszczenia. Obszar wybrany do pobrania gleby powinien umożliwiać długookresowe użytkowanie. Odpowiednie do tego są stałe pastwiska, pola okresowo zasiewane zbożami (z wyjątkiem kukurydzy) lub gęsto nawożone zielonką. Wybrany obszar do pobierania próbek nie powinien być poddawany działaniu produktów ochrony upraw przez co najmniej jeden rok przed pobraniem próbek. Nie powinno się również podawać żadnych nawozów organicznych przez co najmniej sześć miesięcy. Stosowanie nawozów mineralnych jest dozwolone tylko wtedy, gdy jest zgodne z wymogami upraw i próbki gleby nie powinny być pobierane przez co najmniej trzy miesiące po podaniu nawozu. Należy unikać stosowania gleb poddanych działaniu nawozów o znanym działaniu biologicznym (np. cyjanamid wapnia).

Pobierania próbek należy unikać podczas lub bezpośrednio po dłuższych okresach (przekraczających 30 dni) suszy lub zalania wodą. Dla gleb zaoranych, próbki powinny być pobierane z głębokości od 0 do 20 cm. Dla łąk (pastwisk) lub innych gleb, które nie są orane przez dłuższy czas (przynajmniej jeden sezon wegetacyjny), maksymalna głębokość pobierania próbek może być nieco większa niż 20 cm (np. do 25 cm).

Próbki gleb powinny być transportowane przy użyciu odpowiednich pojemników i w warunkach temperaturowych gwarantujących, że początkowe własności gleby nie zostaną znacząco zmienione.

1.6.3.2. *Przechowywanie*

Preferuje się stosowanie gleb świeżo zebranych. Jeżeli nie można uniknąć przechowywania w laboratorium, gleba może być przechowywana w ciemności w temperaturze 4 ± 2 °C przez maksymalnie trzy miesiące. Należy zapewnić warunki do napowietrzania gleby podczas jej przechowywania. Jeżeli gleby są pobierane z obszarów, które zamarzają przez przynajmniej trzy miesiące w roku, można wziąć pod uwagę przechowywanie przez sześć miesięcy w temperaturze od minus 18 °C do minus 22 °C. Mikrobiologiczna biomasa przechowywanych gleb jest mierzona przed każdym eksperymentem i zawartość węgla w biomasie powinna wynosić co najmniej 1 % całkowitej zawartości węgla organicznego w glebie (zob. sekcja 1.6.2).

1.6.4. **Postępowanie i przygotowanie gleby do badań**

1.6.4.1. *Inkubacja wstępna*

Jeżeli gleba była przechowywana (zob. sekcja 1.6.4.2), zalecana jest wstępna inkubacja przez okres 2–28 dni. Temperatura i zawartość wilgoci w glebie podczas wstępnej inkubacji powinny być podobne do tych, jakie będą w czasie badania (zob. sekcje 1.6.4.2 i 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2 *Właściwości fizyczno-chemiczne*

Z gleby usuwane są ręcznie większe obiekty (to jest kamienie, części roślin itp.) i jest przesiewana na wilgotno, bez nadmiernego wysuszenia do ziarnistości mniejszej lub równej 2 mm. Zawartość wilgoci w próbce gleby powinna zostać zwiększona przy użyciu wody destylowanej lub dejonizowanej do wartości pomiędzy 40 a 60 % maksymalnej pojemności wodnej.

1.6.4.3. *Wzbogacanie substratem organicznym*

Gleba powinna zostać wzbogacona odpowiednim substratem organicznym, np. mączką części zielonych lucerny (główny komponent to *Medicago sativa*) ze stosunkiem C/N od 12/1 do 16/1. Zalecany jest dodatek lucerny do gleby w ilości 5 g lucerny na kilogram gleby (sucha masa).

1.6.5. **Przygotowanie substancji badanej do podania do gleby**

Substancja badana jest zazwyczaj podawana przy użyciu nośnika. Nośnikiem może być woda (dla substancji rozpuszczalnych w wodzie) lub obojętne ciało stałe, takie jak drobnoziarnisty piasek kwarcowy (rozmiar ziaren 0,1–0,5 mm). Należy unikać nośników ciekłych innych niż woda (np. organiczne rozpuszczalniki, takie jak aceton, chloroform), ponieważ mogą niszczyć mikroflorę. Jeżeli stosowanym nośnikiem jest piasek, może on być powleczony badaną substancją rozpuszczoną lub zawieszoną w odpowiednim rozpuszczalniku. W takich przypadkach przed wymieszaniem z glebą należy usunąć rozpuszczalnik przez odparowanie. Dla zachowania optymalnego rozkładu substancji badanej w glebie zaleca się stosowanie 10 g piasku na kilogram gleby (w suchej masie). Próbki kontrolne są poddawane działaniu równoważnej ilości tylko wody i/lub piasku kwarcowego.

Jeżeli badane są lotne substancje chemiczne, powinno się unikać strat podczas poddawania działaniu i należy podjąć próbę zapewnienia jednorodnego rozkładu w glebie (np. badana substancja powinna być nastrzyknięta do gleby w kilku miejscach).

1.6.6. **Stężenia stosowane w badaniach**

Jeżeli badane są substancje agrochemiczne, powinno się stosować przynajmniej dwa stężenia. Niższe stężenie powinno odzwierciedlać przynajmniej maksymalną, oczekiwaną ilość dochodzącą do gleby w praktycznym zastosowaniu, natomiast wyższe stężenie powinno być wielokrotnością niższego. Stężenia substancji badanej dodanej do gleby są obliczane przy założeniu równomiernego wprowadzenia na głębokość 5 cm i gęstości nasypowej gleby 1,5. Dla substancji agrochemicznych dodawanych bezpośrednio do gleby lub dla substancji chemicznych o przewidywalnej ilości dochodzącej do gleby zalecanymi stężeniami do badań są maksymalne przewidywalne stężenia środowiskowe (Predicted Environmental Concentration – PEC) i ich pięciokrotność. Substancje, dla których przewiduje się kilkakrotne stosowanie w jednym sezonie, powinny być badane przy stężeniach wyliczonych poprzez przemnożenie PEC przez oczekiwaną maksymalną liczbę zastosowań. Wyższe badane stężenie nie powinno jednak przekraczać dziesięciokrotności pojedynczej stosowanej maksymalnej ilości. Jeżeli badane są substancje nieagrochemiczne, stosowane są ciągi geometryczne przynajmniej pięciu stężeń. Badane stężenia powinny pokryć zakres potrzebny do określenia wartości EC_x.

▼B

1.7. PROWADZENIE BADANIA

1.7.1. **Warunki ekspozycji**

1.7.1.1. *Próbki badane i kontrolne*

Jeżeli badane są substancje agrochemiczne, gleba dzielona jest na trzy równe wagowo części. Dwie części są mieszane z nośnikiem zawierającym badany produkt, a trzecia jest mieszana z samym nośnikiem (próbka kontrolna). Zalecane są przynajmniej trzy powtórzenia, zarówno dla gleb poddanych działaniu badanej substancji, jak i niepoddanych. Jeżeli badane są środki niebędące substancjami agrochemicznymi, gleba dzielona jest na sześć równych wagowo części. Pięć próbek jest mieszanych z nośnikiem zawierającym substancję badaną, a szósty mieszany jest z samym nośnikiem. Zaleca się trzy powtórzenia, zarówno dla próbek badanych, jak i próbek kontrolnych. Należy zadbać o zapewnienie homogenicznego rozprowadzenia substancji badanej w poddanych jej działaniu próbkach gleby. Podczas mieszania powinno się uniknąć sklejania lub zbrylania gleby.

1.7.1.2. *Inkubacja próbek gleby*

Inkubacja może być prowadzona na dwa sposoby: jako zbiorcze próbki każdej gleby poddanej i niepoddanej działaniu badanej substancji albo jako seria pojedynczych podpróbek równej wielkości, poddanych i niepoddanych działaniu badanej substancji. Jednakże jeżeli badane są substancje lotne, badania powinny być prowadzone jedynie na serii pojedynczych podpróbek. Jeżeli gleby są inkubowane w masie, przygotowywane są duże ilości gleby poddanej i niepoddanej działaniu badanej substancji i podpróbki do analizy są pobierane w miarę potrzeby podczas badania. Ilość przygotowana wstępnie do każdego poddania działaniu i do kontroli zależy od wielkości podpróbek, ilości powtórzeń stosowanych do analizy oraz przewidywanej maksymalnej liczby pobieranych próbek. Gleby inkubowane w jednej objętości powinny zostać dokładnie wymieszane przed podziałem na mniejsze próbki. Jeżeli gleby są inkubowane jako seria pojedynczych próbek, każda poddana działaniu substancji badanej i kontrolna masa gleby jest dzielona na wymaganą liczbę podpróbek, które są wykorzystywane w miarę potrzeb. W eksperymentach, gdzie przewiduje się więcej niż dwa próbkowania, powinna być przygotowywana wystarczająca liczba podpróbek do wszystkich powtórzeń i próbkowań. Przynajmniej trzy powtórzone próbki badanej gleby powinny być inkubowane w warunkach napowietrzania (zob. sekcja 1.7.1.1). Podczas wszystkich badań powinny być stosowane odpowiednie pojemniki, z wystarczającą przestrzenią nad powierzchnią próbki, w celu uniknięcia rozwoju warunków beztlenowych. Jeżeli badane są substancje lotne, badanie powinno być prowadzone wyłącznie na serii pojedynczych podpróbek.

1.7.1.3. *Warunki badań i czas ich trwania*

Badanie jest prowadzone w ciemności w temperaturze pokojowej 20 ± 2 °C. Zawartość wilgoci w próbkach gleb podczas badania powinna wynosić 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej (zob. sekcja 1.6.4.2) w przedziale ± 5 %. Można dodawać wodę destylowaną i dejonizowaną, stosownie do potrzeb.

Minimalny czas trwania badań wynosi 28 dni. Jeżeli badane są substancje agrochemiczne, porównywane są szybkości tworzenia azotanów próbki badanej i kontrolnej. Jeżeli 28 dnia wyniki różnią się od siebie o więcej niż 25 %, badanie jest kontynuowane aż do osiągnięcia wartości równej lub mniejszej od 25 % lub przez maksymalnie 100 dni, w zależności od tego, co nastąpi wcześniej. Dla substancji niebędących agrochemicznymi badanie przerywa się po 28 dniach. 28 dnia oznaczane są ilości azotanów w próbce badanej i kontrolnej i obliczane są wartości EC_x.

▼B

1.7.2. **Próbkowanie i analiza gleb**

1.7.2.1. *Harmonogram próbkowania gleb*

Jeżeli badane są substancje agrochemiczne, próbki gleby są analizowane pod kątem azotanów w dniach 0, 7, 14 i 28. Jeżeli wymagane jest przedłużenie badania, dalsze pomiary powinny być wykonywane co 14 dni po dniu 28.

Jeżeli badane są substancje nieagrochemiczne, stosuje się przynajmniej pięć stężeń i próbki gleby są analizowane na azotany na początku (dzień 0) i na końcu okresu ekspozycji (28 dzień). Można dodać pomiary pośrednie, np. 7 dnia, jeżeli zostanie to uznane za konieczne. Dane uzyskane 28 dnia są stosowane do wyznaczenia wartości EC_x dla substancji chemicznej. Jeżeli jest to pożądane, można wykorzystać wyniki z dnia 0 dla próbek kontrolnych do podania początkowej ilości azotanów w glebie.

1.7.2.2. *Analizy próbek gleby*

Ilość wytworzonych azotanów w każdej próbce poddanej działaniu badanej substancji i w próbce kontrolnej jest określana przy każdym próbkowaniu. Azotany są ekstrahowane z gleby przez wytrząsanie próbek z odpowiednim rozpuszczalnikiem, to jest 0,1 M roztwór chlorku potasu. Zaleca się 5 ml roztworu KCl na gram suchej masy równoważnej ilości gleby. W celu optymalizacji ekstrakcji pojemnik zawierający glebę i roztwór ekstrakcyjny nie powinien być napełniony bardziej niż do połowy. Mieszanina jest wytrząsana z szybkością 150 rpm przez 60 minut. Mieszanina jest odwirowywana lub filtrowana, a faza ciekła analizowana na azotany. Roztwory wolne od cząstek stałych mogą być przechowywane przed analizą w temperaturze minus 20 ± 5 °C przez okres do sześciu miesięcy.

2. **DANE**

2.1. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Jeżeli badane są substancje agrochemiczne, powinna zostać zarejestrowana ilość wytworzonych azotanów w każdej próbce gleby i wartość średnia wszystkich powtórzeń powinna zostać przedstawiona w formie tabeli. Tempa przemian azotu należy zinterpretować przy użyciu odpowiednich i powszechnie akceptowanych metod statystycznych (np. test F, 5 % poziom istotności). Ilości wytworzonych azotanów wyrażane są w mg azotanów/kg suchej masy gleby/dzień. Tempo tworzenia azotanów w każdej próbce poddanej działaniu badanej substancji jest porównywane z próbką kontrolną i obliczane jest odchylenie procentowe od próbki kontrolnej.

Jeżeli badane są substancje niebędące agrochemicznymi, oznaczana jest ilość utworzonych azotanów w każdym powtórzeniu i do oceny wartości EC_x przygotowywana jest krzywa zależności dawka-odpowiedź. Ilości azotanów (to jest mg azotanów/kg suchej masy gleby) oznaczone w badanych próbkach po 28 dniach są porównywane z wartościami określonymi dla próbki kontrolnej. Na podstawie tych danych obliczane są wielkości % inhibicji dla każdego badanego stężenia. Te wartości procentowe są wykreślane w zależności od stężenia, a następnie wykorzystuje się procedury statystyczne do obliczenia wartości EC_x. Granice przedziału ufności ($p = 0,95$) dla obliczanej wartości EC_x są również określane przy użyciu standardowych procedur (10)(11)(12).

Badane substancje zawierające wysokie ilości azotu mogą przyczyniać się do ilości azotanów wytworzonych w czasie badań. Jeżeli te substancje są badane w dużych stężeniach (np. związki chemiczne przewidziane do wielokrotnego stosowania), w badaniach trzeba uwzględnić odpowiednie próbki kontrolne (tj. gleba i substancja badana, ale bez mączki roślinnej). Dane z tych próbek kontrolnych muszą zostać uwzględnione w obliczeniach EC_x.

▼B

2.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Jeżeli są oceniane wyniki badań substancji agrochemicznych i różnica tempa tworzenia azotanów pomiędzy niższym stężeniem (to jest maksymalne przewidywane stężenie) a próbką kontrolną jest mniejsza lub równa 25 %, w którymkolwiek momencie pomiarów po upływie 28 dni, produkt może zostać oceniony, jako niemający długookresowego wpływu na przemiany azotu w glebie. Jeżeli oceniane są wyniki uzyskane dla substancji chemicznych innych niż agrochemiczne, stosowane są wartości EC_{50}, EC_{25} i/lub EC_{10}.

3. **SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

Raport z badań musi zawierać następujące informacje:

Pełną identyfikację używanej gleby, w tym:

— położenie geograficzne miejsca (długość, szerokość),

— informacje o historii miejsca (to jest szata roślinna, podawanie środków ochrony upraw, nawożenie, przypadkowe zanieczyszczenia itp.),

— przykłady wykorzystania (gleby uprawne, lasy itp.),

— głębokość pobierania próbek (cm),

— zawartości piasku/iłów/gliny (% suchej masy),

— pH (w wodzie),

— zawartość węgla organicznego (% suchej masy),

— zawartość azotu (% suchej masy),

— początkowe stężenie azotanów (mg azotanów/kg suchej masy),

— zdolność wymiany kationów (mmol/kg),

— mikrobiologiczna biomasa wyrażona jako procent węgla organicznego,

— odniesienia do metod stosowanych do oznaczania wszystkich parametrów,

— wszystkie informacje odnoszące się do pobierania i przechowywania próbek gleby,

— szczegóły wstępnej inkubacji gleby, jeżeli była stosowana.

Substancja badana:

— charakter fizyczny i w razie potrzeby własności fizyczno-chemiczne,

— dane identyfikacji chemicznej, w razie potrzeby, w tym wzór strukturalny, czystość (tj. dla środków ochrony upraw procent składnika aktywnego), zawartość azotu.

Substrat:

— źródło substratu,

— skład (to jest mączka z lucerny, mączka z części zielonych lucerny),

— stężenie węgla i azotu (% suchej masy),

— ziarnistość (mm).

▼B

Warunki badania:

— informacje szczegółowe dotyczące wzbogacenia gleby substratem organicznym,

— liczba użytych stężeń badanej substancji chemicznej i w razie potrzeby uzasadnienie wybranych stężeń,

— szczegółowe informacje dotyczące podania substancji badanej do gleby,

— temperatura inkubacji,

— zawartość wilgoci na początku i w trakcie badania,

— zastosowana metoda inkubacji gleby (to jest w całej objętości lub w serii pojedynczych próbek),

— liczba powtórzeń,

— liczba poborów próbek,

— metoda zastosowana do ekstrakcji azotanów z gleby.

Wyniki:

— procedura analityczna i wyposażenie stosowane do analizy azotanów,

— dane tabelaryczne zawierające pojedyncze i średnie wartości pomiarów azotanów,

— odchylenie pomiędzy powtórzeniami dla próbki badanej i kontrolnej,

— wyjaśnienie poprawek wprowadzonych w obliczeniach, jeżeli dotyczy,

— odchylenie procentowe dla stopnia tworzenia azotanów dla każdego próbkowania lub, w razie potrzeby, EC_{50} z 95 % granicą poziomu ufności, inne EC_x (to jest EC_{25} lub EC_{10}) z podaniem przedziałów ufności oraz wykres reakcji na dawkę,

— statystyczne opracowanie wyników,

— wszystkie informacje i obserwacje pomocne w interpretacji wyników.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(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, Bruxelles.

(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, Italie, 18–20 janvier 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, 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. MIKROORGANIZMY GLEBOWE: BADANIE PRZEMIAN WĘGLA

1. METODA

Ta metoda jest równoważna OECD TG 217 (2000).

1.1. WPROWADZENIE

Ta metoda badawcza opisuje metodę laboratoryjną opracowaną do badania potencjalnych długoterminowych skutków jednorazowego poddania działaniu środków ochrony upraw i innych substancji chemicznych dla przemian węgla spowodowanych przez mikroorganizmy glebowe. To badanie jest oparte głównie na zaleceniach Europejskiej i Śródziemnomorskiej Organizacji Ochrony Roślin (1). Jednakże inne wytyczne, w tym wytyczne German Biologische Bundesanstalt (2), Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (3) i SETAC (4) także zostały wzięte pod uwagę. W czasie warsztatów OECD na temat Selekcji Gleb/Osadów, mających miejsce w Belgirate we Włoszech w 1995 (6), ustalono ilość i rodzaj gleb stosowanych w tym badaniu. Zalecenia w sprawie pobierania, przenoszenia i przechowywania próbek gleby są oparte na wytycznych metodycznych według ISO (6) i zaleceniach z warsztatów w Belgirate.

W ocenie i interpretacji toksycznych właściwości badanej substancji może być wymagane określenie skutków działania dla aktywności mikrobiologicznej np. jeżeli są wymagane dane na temat potencjalnych efektów ubocznych działania środków ochrony upraw dla mikroflory glebowej lub jeżeli spodziewane jest wystawienie mikroorganizmów na działanie związków chemicznych innych niż środki ochrony upraw. Badanie przemian węgla jest prowadzone w celu określenia wpływu działania takich substancji chemicznych na mikroflorę. Jeżeli badane są substancje agrochemiczne (np. środki ochrony upraw, nawozy, związki chemiczne stosowane w leśnictwie), to są prowadzone zarówno badania przemian węgla, jak i azotu. Jeżeli badane są substancje nieagrochemiczne, wystarczające jest badanie przemian azotu. Jednakże jeżeli wartości EC_{50} w badaniach przemian azotu znajdą się w zakresie, w którym taki związek chemiczny uznaje się za dostępny w handlu inhibitor nitryfikacji (np. nitropiryna), można przeprowadzić badania przemian azotu w celu uzyskania dodatkowych informacji.

Gleby składają się ze składników ożywionych i nieożywionych, które występują w złożonych i heterogenicznych mieszaninach. Mikroorganizmy odgrywają istotną rolę w rozkładzie i przemianie materii organicznej w żyznych glebach, gdzie wiele gatunków przyczynia się do różnych aspektów żyzności gleby. Jakikolwiek długookresowy wpływ na procesy biochemiczne może potencjalnie zakłócić obieg substancji biogennych, a to może zmienić żyzność gleb. Przemiany węgla i azotu występują we wszystkich żyznych glebach. Pomimo że biocenozy bakteryjne różnią się w poszczególnych rodzajach gleb, szlaki przemian są w zasadzie takie same.

▼B

Ta metoda badawcza jest przeznaczona do wykrywania długookresowych, niepomyślnych skutków działania substancji dla procesów przemian węgla w napowietrzonych, powierzchniowych warstwach gleb. Badanie jest czułe na zmiany wielkości i aktywności biocenoz bakteryjnych odpowiedzialnych za przemiany węgla, ponieważ poddaje te biocenozy zarówno oddziaływaniu chemicznemu, jak i deficytowi węgla. Stosowana jest piaszczysta gleba o niskiej zawartości materii organicznej. Ta gleba jest poddawana działaniu badanej substancji, a następnie jest inkubowana w warunkach pozwalających na szybki metabolizm mikrobiologiczny. W tych warunkach źródła łatwo dostępnego węgla w glebie są gwałtownie wyczerpywane. Powoduje to deficyt węgla, który zarówno zabija komórki mikrobiologiczne, jak i powoduje przejście w stan uśpienia i/lub zarodnikowania. Jeżeli badanie trwa dłużej niż 28 dni, suma wszystkich tych reakcji może zostać zmierzona w próbkach kontrolnych (niepoddanych działaniu badanej substancji) jako stopniowy spadek aktywnej metabolicznie biomasy mikrobiologicznej (7). Jeżeli biomasa w glebie ubogiej w węgiel, w warunkach badania, jest poddawana działaniu substancji chemicznej, to może ona nie wrócić do takiego samego poziomu, jak próbka kontrolna. Stąd zaburzenia spowodowane przez badaną substancję w dowolnym momencie podczas badania często trwają aż do zakończenia badania.

Badania, na podstawie których zastała opracowana ta metoda badawcza, były na początku przeznaczone dla substancji, dla których można było przewidzieć ich ilość będącą w kontakcie z glebą. Tak się dzieje, na przykład, w przypadku środków ochrony upraw, gdzie znana jest ich ilość podawana w polu. Dla produktów agrochemicznych wystarczające jest badanie dwóch dawek odpowiadających ilości podanej lub przewidywanej. Substancje agrochemiczne mogą być badane jako aktywne dodatki (a.i.) lub jako gotowe produkty. Jednakże badanie nie jest ograniczone do substancji chemicznych o przewidywalnych stężeniach środowiskowych. Zmieniając zarówno ilości substancji badanej podanej do gleby, jak i sposób interpretacji wyników, badania mogą być stosowane do substancji chemicznych, których przewidywana ilość będąca w kontakcie z glebą jest nieznana. Wobec tego dla substancji chemicznych innych niż agrochemiczne określa się wpływ różnych stężeń na przemianę węgla. Wyniki tych badań są wykorzystywane do przygotowania wykresu reakcji na dawkę i obliczenia wartości EC_x, gdzie x zdefiniowano jako % oddziaływania.

1.2. DEFINICJE

Przemiany węgla: to degradacja materii organicznej w wyniku działania mikroorganizmów do końcowych, nieorganicznych produktów przemiany, jakim jest ditlenek węgla.

EC_x (stężenie efektywne): to stężenie substancji badanej w glebie, które powoduje x-procentową inhibicję przemian węgla do ditlenku węgla.

EC_{50} (mediana stężenia efektywnego): stężenie substancji w glebie, które powoduje 50-procentową inhibicję przemian węgla do ditlenku węgla.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

▼B

1.4. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Przesiana gleba jest albo poddawana działaniu substancji badanej, albo pozostawiona nienaruszona (próbka kontrolna). Jeżeli badane są substancje agrochemiczne, zaleca się stosowanie przynajmniej dwóch stężeń i powinny one być wybrane w odniesieniu do najwyższego stężenia, jakie może występować w terenie. Po 0, 7, 14 i 28 dniach inkubacji próbki gleb poddanych działaniu badanej substancji i próbki kontrolne są mieszane z glukozą i przez kolejne 12 godzin jest mierzone tempo respiracji indukownej glukozy. Tempo respiracji wyraża się ilością uwolnionego ditlenku węgla (mg dwutlenku węgla/kg suchej gleby/h) lub ilością pochłoniętego tlenu (mg tlenu/kg suchej gleby/h). Średnie tempo respiracji w próbce gleby poddanej działaniu badanej substancji jest porównywane z tempem respiracji dla próbki kontrolnej, a następnie oblicza się odchylenie procentowe próbki badanej od próbki kontrolnej. Wszystkie badania są prowadzone przynajmniej przez 28 dni. Jeżeli 28 dnia różnice pomiędzy glebami badanymi a kontrolnymi będą równe lub większe niż 25 %, badania kontynuuje się w odstępach 14-dniowych przez maksymalnie 100 dni. Jeżeli badane są substancje nieagrochemiczne, do próbek gleby dodawana jest seria stężeń badanej substancji i po 28 dniach mierzone są tempa respiracji indukowanej glukozą (to jest średnia ilość wytworzonego ditlenku węgla lub zużytego tlenu). Wyniki badań z serii stężeń są analizowane przy użyciu modelu regresyjnego i obliczane są wartości EC_x (to jest EC_{50}, EC_{25} i/lub EC_{10}). Zob. definicje.

1.5. WAŻNOŚĆ BADANIA

Oceny wyników badań substancji agrochemicznych są oparte na stosunkowo niewielkich różnicach (średnia wartość ± 25 %) pomiędzy uwolnionym ditlenkiem węgla lub zużytym tlenem w (lub przez) kontrolnych i badanych próbkach gleby, więc duże różnice próbek kontrolnych mogą prowadzić do fałszywych wyników. Z tego powodu odchylenia pomiędzy powtórzeniami próbek kontrolnych powinny być mniejsze niż ± 15 %.

1.6. OPIS METODY BADANIA

1.6.1. **Aparatura**

Stosowane są pojemniki z materiałów chemicznie obojętnych. Powinny one mieć odpowiednią pojemność zgodnie z procedurą stosowaną do inkubacji gleb, to jest inkubacji w masie lub jako serii pojedynczych próbek gleby (zob. sekcja 1.7.1.2). Powinno się zwrócić uwagę na minimalizację utraty wody i umożliwienie wymiany gazów podczas badania (np. pojemniki do badań mogą być przykryte perforowaną folią polietylenową). Jeżeli badane są substancje lotne, powinno się stosować pojemniki umożliwiające uszczelnienie i gazoszczelne. Powinny być takiej wielkości, aby około jednej czwartej ich objętości było wypełnione próbką gleby.

Dla oznaczenia respiracji indukowanej glukozą, wymagany jest system inkubacyjny oraz przyrządy do pomiaru produkcji ditlenku węgla lub zużycia tlenu. Przykłady takich systemów i urządzeń można znaleźć w literaturze (8)(9)(10)(11).

1.6.2. **Wybór i ilość próbek gleb**

Stosowany jest jeden rodzaj gleb. Zalecanymi własnościami gleby są:

— zawartość piasku: nie mniej niż 50 % i nie więcej niż 75 %,

▼B

— pH: 5,5–7,5,

— zawartość węgla organicznego: 0,5–1,5 %,

— powinna zostać zmierzona mikrobiologiczna biomasa (12)(13) i jej zawartość węgla powinna wynosić przynajmniej 1 % całkowitej masy węgla organicznego w glebie.

Przeważnie gleby o takich własnościach stanowią najgorszy przypadek, ponieważ adsorpcja badanej substancji chemicznej jest minimalna, a jej dostępność dla mikroflory maksymalna. Wynika z tego, że badania innych gleb są na ogół niepotrzebne. Jednakże w pewnych okolicznościach, to jest gdy przewiduje się, że substancja badana będzie stosowana głównie w określonych glebach, takich jak kwaśne gleby leśne lub dla substancji chemicznych z ładunkiem elektrostatycznym, może być konieczne zastosowanie dodatkowych rodzajów gleb.

1.6.3. **Pobieranie i przechowywanie próbek gleby**

1.6.3.1. *Pobieranie*

Powinny być dostępne szczegółowe informacje na temat historii obszaru, z jakiego została pobrana badana próbka gleby. Szczegółowe informacje powinny obejmować dokładną lokalizację, szatę roślinną, daty poddania działaniu środków ochrony upraw, podanie nawozów organicznych lub nieorganicznych, dodanie materiałów biologicznych lub przypadkowe zanieczyszczenia. Obszar wybrany do pobrania gleby powinien umożliwiać długookresowe użytkowanie. Odpowiednie do tego są stałe pastwiska, pola okresowo zasiewane zbożami (z wyjątkiem kukurydzy) lub gęsto nawożone zielonką. Wybrany obszar do pobierania próbek nie powinien być poddawany działaniu produktów ochrony upraw przez co najmniej jeden rok przed pobraniem próbek. Nie powinno się również podawać żadnych nawozów organicznych przez co najmniej sześć miesięcy. Stosowanie nawozów mineralnych jest dozwolone tylko wtedy, gdy jest zgodne z wymogami upraw i próbki gleby nie powinny być pobierane przez co najmniej trzy miesiące po podaniu nawozu. Należy unikać stosowania gleb poddanych działaniu nawozów o znanym działaniu biologicznym (np. cyjanamid wapnia).

Pobierania próbek należy unikać podczas lub bezpośrednio po dłuższych okresach (przekraczających 30 dni) suszy lub zalania wodą. Dla gleb zaoranych próbki powinny być pobierane z głębokości od 0 do 20 cm. Dla łąk (pastwisk) lub innych gleb, które nie są orane przez dłuższy czas (przynajmniej jeden sezon wegetacyjny), maksymalna głębokość pobierania próbek może być nieco większa niż 20 cm (np. do 25 cm). Próbki gleb powinny być transportowane przy użyciu odpowiednich pojemników i w warunkach temperaturowych gwarantujących, że początkowe własności gleby nie zostaną znacząco zmienione.

1.6.3.2. *Przechowywanie*

Preferuje się stosowanie gleb świeżo zebranych. Jeżeli nie można uniknąć przechowywania w laboratorium, gleba może być przechowywana w ciemności w temperaturze 4 ± 2 °C przez maksymalnie trzy miesiące. Należy zapewnić warunki do napowietrzania gleby podczas jej przechowywania. Jeżeli gleby są pobierane z obszarów, które zamarzają przez przynajmniej trzy miesiące w roku, można wziąć pod uwagę przechowywanie przez sześć miesięcy w temperaturze minus 18 °C. Mikrobiologiczna biomasa przechowywanych gleb jest mierzona przed każdym eksperymentem i zawartość węgla w biomasie powinna wynosić co najmniej 1 % całkowitej zawartości węgla organicznego w glebie (zob. sekcja 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Postępowanie i przygotowanie gleby do badań**

1.6.4.1. *Inkubacja wstępna*

Jeżeli gleba była przechowywana (zob. sekcje 1.6.4.2 i 1.7.1.3), zalecana jest wstępna inkubacja przez okres 2–28 dni. Temperatura i zawartość wilgoci w glebie podczas wstępnej inkubacji powinny być podobne do tych, jakie będą stosowane w czasie badania (zob. sekcje 1.6.4.2 i 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Właściwości fizyczno-chemiczne*

Z gleby usuwane są ręcznie większe obiekty (to jest kamienie, części roślin itp.) i jest ona przesiewana na wilgotno, bez nadmiernego wysuszenia do ziarnistości mniejszej lub równej 2 mm. Zawartość wilgoci w próbce gleby powinna zostać zwiększona przy użyciu wody destylowanej lub dejonizowanej do wartości pomiędzy 40 a 60 % maksymalnej zdolności utrzymywania wody.

1.6.5. **Przygotowanie substancji badanej do podania do gleby**

Substancja badana jest zazwyczaj podawana przy użyciu nośnika. Nośnikiem może być woda (dla substancji rozpuszczalnych w wodzie) lub obojętne ciało stałe, takie jak drobnoziarnisty piasek kwarcowy (rozmiar ziaren 0,1–0,5 mm). Należy unikać nośników ciekłych innych niż woda (np. organiczne rozpuszczalniki, takie jak aceton, chloroform), ponieważ mogą niszczyć mikroflorę. Jeżeli stosowanym nośnikiem jest piasek, może on być powleczony badaną substancją rozpuszczoną lub zawieszoną w odpowiednim rozpuszczalniku. W takich przypadkach przed wymieszaniem z glebą należy usunąć rozpuszczalnik przez odparowanie. Dla zachowania optymalnego rozkładu substancji badanej w glebie, zaleca się stosowanie 10 g piasku na kilogram gleby (w suchej masie). Próbki kontrolne są poddawane działaniu równoważnej ilości tylko wody i/lub piasku kwarcowego.

Jeżeli badane są lotne substancje chemiczne, powinno się unikać strat podczas poddawania działaniu i należy podjąć próbę zapewnienia jednorodnego rozkładu w glebie (np. badana substancja powinna być nastrzyknięta do gleby w kilku miejscach).

1.6.6. **Stężenia stosowane w badaniach**

Jeżeli badane są środki ochrony upraw lub inne substancje chemiczne o przewidywalnym stężeniu środowiskowym, powinno się stosować przynajmniej dwa stężenia. Niższe stężenie powinno odzwierciedlać przynajmniej maksymalną, oczekiwaną ilość dochodzącą do gleby w praktycznym zastosowaniu, natomiast wyższe stężenie powinno być wielokrotnością niższego. Stężenia substancji badanej dodanej do gleby są obliczane przy założeniu równomiernego wprowadzenia na głębokość 5 cm i gęstości nasypowej gleby 1,5. Dla substancji agrochemicznych dodawanych bezpośrednio do gleby lub dla substancji chemicznych, o przewidywalnej ilości dochodzącej do gleby, zalecanymi stężeniami do badań są maksymalne przewidywalne stężenia środowiskowe (Predicted Environmental Concentration – PEC) i ich pięciokrotność. Substancje, dla których przewiduje się kilkakrotne stosowanie w jednym sezonie, powinny być badane przy stężeniach wyliczonych poprzez przemnożenie PEC przez oczekiwaną maksymalną liczbę zastosowań. Wyższe badane stężenie nie powinno jednak przekraczać dziesięciokrotności pojedynczej stosowanej maksymalnej ilości.

Jeżeli badane są substancje nieagrochemiczne, stosowane są ciągi geometryczne przynajmniej pięciu stężeń. Badane stężenia powinny pokryć zakres potrzebny do określenia wartości EC_x.

▼B

1.7. PROWADZENIE BADANIA

1.7.1. **Warunki ekspozycji**

1.7.1.1. *Próbki badane i kontrolne*

Jeżeli badane są substancje agrochemiczne, gleba dzielona jest na trzy równe wagowo części. Dwie części są mieszane z nośnikiem zawierającym badany produkt, a trzecia jest mieszana z samym nośnikiem (próbka kontrolna). Zalecane są przynajmniej trzy powtórzenia, zarówno dla gleb poddanych działaniu badanej substancji, jak i niepoddanych. Jeżeli badane są środki niebędące substancjami agrochemicznymi, gleba dzielona jest na sześć równych wagowo części. Pięć próbek jest mieszanych z nośnikiem zawierającym substancję badaną, a szósty mieszany jest z samym nośnikiem. Zaleca się trzy powtórzenia, zarówno dla próbek badanych, jak i próbek kontrolnych. Należy zadbać o zapewnienie homogenicznego rozprowadzenia substancji badanej w poddanych jej działaniu próbkach gleby. Podczas mieszania powinno się uniknąć sklejania lub zbrylania gleby.

1.7.1.2. *Inkubacja próbek gleby*

Inkubacja może być prowadzona na dwa sposoby: jako zbiorcze próbki każdej gleby poddanej i niepoddanej działaniu badanej substancji, albo jako seria pojedynczych podpróbek równej wielkości, poddanych i niepoddanych działaniu badanej substancji. Jednakże jeżeli badane są substancje lotne, badania powinny być prowadzone jedynie na serii pojedynczych podpróbek. Jeżeli gleby są inkubowane w masie, przygotowywane są duże ilości gleby poddanej i niepoddanej działaniu badanej substancji i podpróbki do analizy są pobierane w miarę potrzeby podczas badania. Ilość przygotowana wstępnie do każdego poddania działaniu i do kontroli zależy od wielkości podpróbek, ilości powtórzeń stosowanych do analizy oraz przewidywanej maksymalnej liczby pobieranych próbek. Gleby inkubowane w jednej objętości powinny zostać dokładnie wymieszane przed podziałem na mniejsze próbki. Jeżeli gleby są inkubowane jako seria pojedynczych próbek, każda poddana działaniu substancji badanej i kontrolna masa gleby jest dzielona na wymaganą liczbę podpróbek, które są wykorzystywane w miarę potrzeb. W eksperymentach, gdzie przewiduje się więcej niż dwa próbkowania, powinna być przygotowywana wystarczająca liczba podpróbek do wszystkich powtórzeń i próbkowań. Przynajmniej trzy powtórzone próbki badanej gleby powinny być inkubowane w warunkach napowietrzania (zob. sekcja 1.7.1.1). Podczas wszystkich badań powinny być stosowane odpowiednie pojemniki, z wystarczającą przestrzenią nad powierzchnią próbki, w celu uniknięcia rozwoju warunków beztlenowych. Jeżeli badane są substancje lotne, badanie powinno być prowadzone wyłącznie na serii pojedynczych podpróbek.

1.7.1.3. *Warunki badań i czas ich trwania*

Badanie jest prowadzone w ciemności w temperaturze pokojowej 20 ± 2 °C. Zawartość wilgoci w próbkach gleb podczas badania powinna wynosić 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej (zob. sekcja 1.6.4.2) w przedziale ± 5 %. Można dodawać wodę destylowaną i dejonizowaną, stosownie do potrzeb.

Minimalny czas trwania badań wynosi 28 dni. Jeżeli badane są substancje agrochemiczne, porównywane są ilości wydzielonego ditlenku węgla lub zużytego tlenu dla próbki badanej i kontrolnej. Jeżeli 28 dnia wyniki różnią się od siebie o więcej niż 25 %, badanie jest kontynuowane aż do osiągnięcia wartości równej lub mniejszej od 25 % lub przez maksymalnie 100 dni, w zależności od tego, co nastąpi wcześniej. Jeżeli badane są substancje niebędące środkami agrochemicznymi, badanie przerywa się po 28 dniach. 28 dnia oznaczane są ilości wydzielonego ditlenku węgla lub zużytego tlenu w próbce badanej i kontrolnej i obliczane są wartości EC_x.

▼B

1.7.2. **Próbkowanie i analiza gleb**

1.7.2.1. *Harmonogram próbkowania gleb*

Jeżeli badane są substancje agrochemiczne, próbki gleby są analizowane pod kątem oddychania pod wpływem glukozy w dniach 0, 7, 14 i 28. Jeżeli wymagane jest przedłużenie badania, dalsze pomiary powinny być wykonywane co 14 dni po dniu 28.

Jeżeli badane są substancje nieagrochemiczne, stosuje się przynajmniej pięć stężeń i próbki gleby są analizowane na respirację wywołaną glukozą na początku (dzień 0) i na końcu okresu ekspozycji (28 dzień). Można dodać pomiary pośrednie, np. 7 dnia, jeżeli zostanie to uznane za konieczne. Dane uzyskane 28 dnia są stosowane do wyznaczenia wartości EC_x dla substancji chemicznej. Jeżeli jest to pożądane, można wykorzystać wyniki z dnia 0 próbek kontrolnych do oszacowania początkowych ilości aktywnej metabolicznie biomasy mikrobiologicznej w glebie (12).

1.7.2.2. *Pomiary tempa respiracji indukowanej glukozą*

Tempo respiracji indukowanej glukozą w każdej próbce badanej i kontrolnej jest określane przy każdorazowym próbkowaniu. Próbki gleby są mieszane z odpowiednią ilością glukozy w celu wywołania warunków do natychmiastowej reakcji respiracyjnej. Ilość glukozy potrzebnej do wywołania maksymalnej reakcji respiracyjnej dla danej gleby może zostać wyznaczona we wstępnym badaniu z wykorzystaniem serii stężeń glukozy (14). Jednakże dla piaszczystych gleb zawierających 0,5–1,5 % węgla organicznego na ogół wystarczające jest zastosowanie 2 000 mg do 2 000 mg glukozy na kg suchej masy gleby. Glukoza może zostać roztarta z czystym piaskiem kwarcowym (10 g piasku na kg suchej masy gleby) i homogenicznie wymieszana z glebą.

Próbki gleby wzbogaconej glukozą są inkubowane w aparaturze odpowiedniej do mierzenia tempa respiracji albo w sposób ciągły, albo co godzinę bądź co dwie godziny (zob. sekcja 1.6.1) w temperaturze 20 ± 2 °C. Uwalniany ditlenek węgla lub zużyty tlen są mierzone przez kolejnych 12 godzin, a pomiary powinny rozpocząć się tak szybko, jak to możliwe, to jest w ciągu 1–2 godzin od dodania glukozy. Określa się całkowite ilości wydzielonego ditlenku węgla lub pochłoniętego tlenu w ciągu 12 godzin i wyznacza się średnią wartość tempa respiracji.

2. **DANE**

2.1. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Jeżeli badane są substancje agrochemiczne, powinien zostać zapisany uwolniony ditlenek węgla lub pochłonięty tlen z każdej próbki gleby i wartość średnia wszystkich powtórzeń powinna zostać przedstawiona w formie tabeli. Wyniki powinny należy zinterpretować przy użyciu odpowiednich i powszechnie akceptowanych metod statystycznych (np. test F, 5 % poziom istotności). Tempo respiracji indukowanej glukozą jest wyrażane w mg ditlenku węgla/kg suchej masy gleby/h lub mg tlenu/kg suchej masy gleby/h. Średnie tempo tworzenia się ditlenku węgla lub średnie tempo pochłaniania tlenu dla każdej badanej próbki jest porównywane z próbką kontrolną i obliczane jest odchylenie procentowe od próbki kontrolnej.

▼B

Jeżeli badane są substancje nieagrochemiczne, oznacza się ilość wydzielonego ditlenku węgla lub pochłoniętego tlenu przez każdą próbkę i do oceny wartości EC_x przygotowywana jest krzywa zależności dawka-reakcja. Tempo respiracji indukowanej glukozą (to jest mg ditlenku węgla/kg suchej masy gleby/h lub mg tlenu/kg suchej masy gleby/h) określone w badanych próbkach jest porównywane z wartością określoną dla próbki kontrolnej. Na podstawie tych danych obliczane są wielkości % inhibicji dla każdego badanego stężenia. Te wartości procentowe są wykreślane w zależności od stężenia, a następnie wykorzystuje się procedury statystyczne do obliczenia wartości EC_x. Granice przedziału ufności (p = 0,95) dla obliczanej wartości EC_x są również określane przy użyciu standardowych procedur (15)(16)(17).

2.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Jeżeli są oceniane wyniki badań substancji agrochemicznych i różnica między tempem respiracji przy niższym stężeniu (to jest maksymalne przewidywane stężenie) a tempem respiracji próbki kontrolnej jest mniejsza lub równa 25 %, w którymkolwiek momencie pomiarów po upływie 28 dni, produkt może zostać oceniony, jako niemający długookresowego wpływu na przemiany węgla w glebie. Jeżeli oceniane są wyniki uzyskane dla substancji chemicznych innych niż agrochemiczne, stosowane są wartości EC_{50}, EC_{25} i/lub EC_{10}.

3. **SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

RAPORT Z BADAŃ

Raport z badań musi zawierać następujące informacje:

Pełną identyfikację używanej gleby, w tym:

— położenie geograficzne miejsca (długość, szerokość),

— informacje o historii miejsca (to jest szata roślinna, podawanie środków ochrony upraw, nawożenie, przypadkowe zanieczyszczenia itp.),

— przykłady wykorzystania (gleby uprawne, lasy itp.),

— głębokość pobierania próbek (cm),

— zawartości piasku/iłów/gliny (% suchej masy),

— pH (w wodzie),

— zawartość węgla organicznego (% suchej masy),

— zawartość azotu (% suchej masy),

— zdolność wymiany kationów (mmol/kg),

— początkowa mikrobiologiczna biomasa wyrażona jako procent węgla organicznego,

— odniesienia do metod stosowanych do oznaczania wszystkich parametrów,

— wszystkie informacje odnoszące się do pobierania i przechowywania próbek gleby,

— szczegóły wstępnej inkubacji gleby jeżeli była stosowana.

▼B

Substancja badana:

— charakter fizyczny i w razie potrzeby własności fizyczno-chemiczne,

— dane identyfikacji chemicznej, w razie potrzeby, w tym wzór strukturalny, czystość (t.j. dla środków ochrony upraw procent składnika aktywnego), zawartość azotu.

Warunki badania:

— informacje szczegółowe dotyczące wzbogacenia gleby substratem organicznym,

— liczba użytych stężeń badanej substancji chemicznej i w razie potrzeby uzasadnienie wybranych stężeń,

— szczegółowe informacje dotyczące podania substancji badanej do gleby,

— temperatura inkubacji,

— zawartość wilgoci na początku i w trakcie badania,

— zastosowana metoda inkubacji gleby (to jest w całej objętości lub w serii pojedynczych próbek),

— liczba powtórzeń,

— czas poborów próbek,

Wyniki:

— metoda i wyposażenie stosowane do pomiaru szybkości oddychania,

— dane tabelaryczne zawierające pojedyncze i średnie wartości ilości ditlenku węgla lub tlenu,

— odchylenie pomiędzy powtórzeniami dla próbki badanej i kontrolnej,

— wyjaśnienie poprawek wprowadzonych w obliczeniach, jeżeli dotyczy,

— odchylenie procentowe dla stopnia oddychania pod wpływem glukozy dla każdego próbkowania lub, w razie potrzeby, EC_{50} z 95 % granicą przedziału ufności, inne EC_x (to jest EC_{25} lub EC_{10}) z podaniem przedziałów ufności oraz wykres reakcji na dawkę,

— statystyczne opracowanie wyników, w razie potrzeby,

— wszystkie informacje i obserwacje pomocne w interpretacji wyników.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(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 grade 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 mineralization 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: Substrateinduced oddychania method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigationextraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegemiber 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. PRZEMIANY W GLEBIE W WARUNKACH NATLENIENIA I BEZTLENOWYCH

1. METODA

Ta metoda badawcza jest równoważna OECD TG 307 (2002).

1.1. WPROWADZENIE

Ta metoda badawcza jest oparta na istniejących wytycznych (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Metoda opisana w tej metodzie badawczej jest przeznaczona do oceny przemian substancji chemicznych w glebie, w warunkach natlenienia i beztlenowych. Eksperymenty są prowadzone w celu wyznaczenia: (i) szybkości przemian substancji badanej; oraz (ii) charakteru i szybkości tworzenia oraz zanikania produktów przemian, których działaniu mogą zostać poddane organizmy w glebie. Takie badania są wymagane dla substancji chemicznych, które są bezpośrednio podawane do gleby lub mogą przeniknąć do środowiska glebowego. Wyniki takich badań laboratoryjnych mogą być także wykorzystane do opracowania protokołów pobierania próbek i analizy dla związanych badań w terenie.

Badania w warunkach tlenowych i beztlenowych jednego rodzaju gleby na ogół wystarczają do oceny szlaków przemian (8)(10)(11). Tempa przemian powinny być określone przy użyciu co najmniej trzech dodatkowych rodzajów gleb (8)(10).

W czasie warsztatów OECD w sprawie wyboru gleb i osadów, które odbyły się w Belgirate we Włoszech w 1995 roku (10), uzgodniono, w szczególności, rodzaje gleb do stosowania w tym badaniu i ich liczbę. Rodzaje badanych gleb powinny być reprezentacyjne dla warunków środowiskowych, w których substancja będzie stosowana lub uwalniania. Na przykład związki chemiczne, które mogą być uwalniane w klimacie subtropikalnym lub tropikalnym, powinny być badane przy pomocy ferrazoli lub nitrozoli (system FAO). Uczestnicy warsztatów podali również zalecenia dotyczące pobierania, przenoszenia i przechowywania próbek gleby na podstawie wytycznych ISO (15). W tej metodzie uwzględniono także gleby pod mokre uprawy ryżu.

1.2. DEFINICJE

Substancja badana: jakakolwiek substancja, czy to związek macierzysty czy też odnośne produkty przemian.

Produkty przemian: wszystkie substancje powstałe w wyniku biotycznych lub abiotycznych reakcji przemian substancji badanej, w tym CO_2, i produkty w pozostałościach związanych.

Pozostałości związane: „Pozostałości związane” stanowią związki w glebie, roślinach lub zwierzętach, które pozostają po ekstrakcji w materiale macierzystym w postaci substancji macierzystej lub jej metabolitu(-ów)/produktów przemiany. Metoda ekstrakcji nie może zmieniać w sposób znaczący samych związków lub struktury materiału macierzystego. Charakter wiązania można częściowo wyjaśnić przez metody ekstrakcji zmieniające materiał macierzysty i wyspecjalizowane techniki analityczne. Do dziś, na przykład, zostały w ten sposób zidentyfikowane wiązania kowalencyjne zjonizowane i sorpcyjne, a także pułapkowanie. Na ogół tworzenie się pozostałości związanych znacząco redukuje biodostępność i bioprzyswajalność (12) (zmodyfikowane w stosunku do IUPAC 1984 (13)).

Przemiany tlenowe: reakcje zachodzące w obecności tlenu cząsteczkowego (14).

▼B

Przemiany beztlenowe: reakcje zachodzące z wykluczeniem tlenu cząsteczkowego (14).

Gleba: jest mieszaniną składników chemicznych mineralnych i organicznych, te drugie zawierają związki o wysokiej zawartości węgla i azotu, i o wysokiej masie atomowej, ożywioną przez drobne (najczęściej mikro-) organizmy. Gleba może występować w dwóch stanach:

a) niezakłóconym, tak jak się rozwijała z upływem czasu, z charakterystycznymi warstwami różnych rodzajów gleb;

b) zakłóconym, jak to ma na ogół miejsce na polach uprawnych lub kiedy próbki są pobierane przez kopanie i stosowane w tej metodzie badawczej (14).

Mineralizacja: to całkowita degradacja związku organicznego do CO_2 i H_2O w warunkach tlenowych lub CH_4, CO_2 i H_2O w warunkach beztlenowych. W kontekście tej metody badawczej, w której stosowane są związki znakowane ^{14}C, mineralizacja oznacza ekstensywną degradację, podczas której znaczone atomy węgla są utleniane z wydzieleniem odpowiedniej ilości $^{14}CO_2$ (14).

Okres półtrwania: $t_{0,5}$ to czas potrzebny do przemiany 50 % substancji badanej, jeżeli przemiana może zostać opisana kinetyką pierwszego rzędu; nie zależy od stężenia.

DT_{50} (czas zaniku 50): czas, w którym stężenie substancji badanej zmniejsza się o 50 %; ta wielkość różni się od okresu półtrwania $t_{0,5}$, jeżeli przemiana nie może zostać opisana kinetyką pierwszego rzędu.

DT_{75} (czas zaniku 75): czas, w jakim stężenie substancji badanej zmniejsza się o 75 %.

DT_{90} (czas zaniku 90): czas, w jakim stężenie substancji badanej zmniejsza się o 90 %.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Substancje odniesienia powinny być stosowane do charakteryzacji i/lub identyfikacji produktów przemian przy pomocy metod spektroskopowych i chromatograficznych.

1.4. ZASTOSOWANIE BADANIA

Metoda może być stosowana do wszystkich substancji chemicznych (nieznakowanych lub znakowanych izotopowo), dla których jest dostępna metoda analityczna o wystarczającej czułości i dokładności. Może być stosowana do związków słabo lotnych, nielotnych, rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych w wodzie. Badanie nie powinno być stosowane do substancji chemicznych o wysokiej lotności z gleby (np. fumigantów, rozpuszczalników organicznych), które nie mogą utrzymać się w glebie w warunkach eksperymentalnych badania.

▼B

1.5. INFORMACJE O SUBSTANCJI BADANEJ

Nieznakowane i znakowane izotopowo substancje badane mogą być stosowane do pomiaru tempa przemian. Materiał znakowany jest wymagany do badania szlaków przemian i do określenia bilansu masowego. Zaleca się znakowanie izotopem ^{14}C, ale inne izotopy, takie jak ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P, także mogą być użyteczne. Na tyle, na ile jest to możliwe, znacznik powinien być umiejscowiony w najbardziej stabilnej części (częściach) cząsteczki ([1]). Czystość substancji badanej powinna wynosić przynajmniej 95 %.

Przed przystąpieniem do badań przemian tlenowych i beztlenowych w glebie, powinny być dostępne następujące informacje na temat substancji badanej:

a) rozpuszczalność w wodzie (metoda A.6),

b) rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych,

c) prężność pary (metoda A.4) i stała proporcjonalności w prawie Henry'ego,

d) współczynnik podziału n-oktanol/woda (metoda A.8),

e) stabilność chemiczna w ciemności (hydroliza) (metoda C.7),

f) pK_a, jeżeli molekuła jest podatna na protonowanie lub deprotonowanie (wytyczne OECD 112) (16).

Inne przydatne informacje mogą obejmować dane na temat toksyczności substancji badanej dla mikroorganizmów w glebie (metody badawcze C.21 i C.22) (16).

Powinny być dostępne metody analityczne (w tym metody ekstrakcji i czyszczenia) do oznaczania ilościowego i identyfikacji substancji badanej i jej produktów przemian.

1.6. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Próbki gleby są poddawane działaniu substancji badanej i inkubowane w ciemności w kolbie biometrycznej lub w układzie przepływowym, w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych (w stałej temperaturze i wilgotności gleby). W odpowiednich odstępach czasu próbki gleby są ekstrahowane i analizowane pod kątem obecności substancji macierzystej i produktów przemian. Produkty lotne są także pobierane do analizy przy użyciu odpowiednich urządzeń do ich absorpcji. Stosując materiał znakowany izotopem ^{14}C, można mierzyć różne stopnie mineralizacji substancji badanej poprzez pułapkowanie wydzielonego $^{14}CO_2$ i można określić bilans masowy, obejmujący tworzenie pozostałości związanych w glebie.

1.7. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

1.7.1. **Odzysk**

Ekstrakcja i analiza przynajmniej podwójnych próbek gleby natychmiast po dodaniu substancji badanej daje, pierwsze wskazanie co do powtarzalności metody analitycznej i jednorodności procedury podawania substancji badanej. Odzysk dla następnych etapów eksperymentu jest podawany przez odnoszący się do nich bilans masowy. Odzysk powinien mieścić się w zakresie 90–110 % dla znakowanych substancji chemicznych (8) i 70–110 % dla nieznakowanych substancji chemicznych (3).

([1]) Na przykład jeżeli substancja badana zawiera jeden pierścień, wymagane jest znakowanie na tym pierścieniu; jeżeli substancja badana zawiera dwa lub więcej pierścieni, mogą być potrzebne oddzielne badania w celu oceny losu każdego znakowanego pierścienia i w celu otrzymania odpowiednich informacji na temat powstawania produktów przemian.

▼B

1.7.2. **Powtarzalność i czułość metody analitycznej**

Powtarzalność metody analitycznej (wyłączając sprawność początkowej ekstrakcji) dla oznaczenia ilościowego substancji badanej i produktów przemian może zostać sprawdzona przez powtórną analizę tego samego ekstraktu z gleby inkubowanej wystarczająco długo, aby doszło do wytworzenia produktów przemian.

Granica wykrywalności (LOD) metody analitycznej dla badanej substancji i produktów przemian powinna wynosić co najmniej 0,01 mg × kg^{-1} gleby (dla substancji badanej) lub 1 % podanej dawki, w zależności od tego, co jest niższe. Granica kwantyfikacji (LOQ) także powinna zostać określona.

1.7.3. **Dokładność danych przemian**

Analiza regresji stężeń substancji badanej w funkcji czasu daje odpowiednie informacje o rzetelności krzywej przemian i pozwala na obliczenie granic przedziału ufności dla okresu półtrwania (w przypadku kinetyki pseudo pierwszorzędowej) lub wartości DT_{50} oraz w razie potrzeby wartości DT_{75} i DT_{90}.

1.8. OPIS METODY

1.8.1. **Wyposażenie i odczynniki**

Układ inkubacyjny składa się ze statycznych systemów zamkniętych lub odpowiednich systemów przepływowych (7)(17). Przykłady odpowiedniej aparatury do przepływowej i kolby biometrycznej do inkubacji gleby są przedstawione odpowiednio na rys. 1 i 2. Obydwa systemy inkubacyjne mają swoje zalety i ograniczenia (7)(17).

Wymagane jest standardowe wyposażenie laboratoryjne, zwłaszcza następujące:

— instrumenty analityczne, takie jak aparaty do GLC, HPLC, TLC, włączając w to odpowiednie układy detekcji do analizy substancji znakowanych i nieznakowanych izotopowo lub metodę inwersji rozrzedzonych izotopów,

— instrumenty do celów identyfikacji (np. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR itp.),

— cieczowy licznik scyntylacyjny,

— aparat do przeprowadzania utleniania do spalania materiałów radioaktywnych,

— wirówka,

— aparatura do ekstrakcji (na przykład wirówka rurowa do zimnej ekstrakcji i aparat ekstrakcyjny Soxhleta do ciągłej ekstrakcji pod chłodnicą zwrotną),

— instrumenty do zatężania roztworów i ekstraktów (np. wirówka próżniowa),

— łaźnia wodna,

— mieszadła mechaniczne (np. zgniatarka, mikser obrotowy).

▼B

Do stosowanych odczynników zalicza się na przykład:

— NaOH, czysty do analizy, 2 mol· dm^{-3}, lub inne odpowiednie zasady (np. KOH, etanoloamina),

— H_2SO_4, czysty do analizy, 0,05 mol· dm^{-3},

— glikol etylenowy, czysty do analizy,

— stałe materiały absorpcyjne, takie jak wapno sodowe i poliuretanowe wkłady,

— rozpuszczalniki organiczne, czyste do analizy, takie jak aceton, metanol itp.,

— ciecz scyntylacyjna.

1.8.2. **Podawanie substancji badanej**

W celu dodania i rozprowadzenia w glebie substancja badana może być rozpuszczona w wodzie (dejonizowanej lub destylowanej) lub w razie potrzeby w minimalnej ilości acetonu lub innego rozpuszczalnika organicznego (6), w jakiej substancja badana jest wystarczająco rozpuszczalna i stabilna. Jednakże ilość wybranego rozpuszczalnika nie powinna mieć znaczącego wpływu na aktywność mikrobiologiczną gleby (zob. sekcje 1.5 i 1.9.2–1.9.3). Należy unikać stosowania rozpuszczalników, które inhibitują aktywność mikrobiologiczną, takich jak: chloroform, dichlorometan i inne rozpuszczalniki fluorowcowane.

Substancja badana może być również dodana w stanie stałym, np. wymieszana z piaskiem kwarcowym (6) lub w małej podpróbce badanej gleby, która została wysuszona na powietrzu i wysterylizowana. Jeżeli substancja badana jest dodawana przy użyciu rozpuszczalnika, rozpuszczalnik powinien zostać odparowany przed dodaniem szczytowej podpróbki do właściwej, niesterylnej próbki gleby.

Dla większości substancji chemicznych, których główną drogą dostępu do gleby jest osad ściekowy/zastosowania rolnicze, substancja badana powinna zostać najpierw dodana do szlamu, który następnie jest wprowadzany do próbki gleby (zob. sekcje 1.9.2 i 1.9.3).

Stosowanie gotowych produktów nie jest rutynowo zalecane. Jednakże np. dla słabo rozpuszczalnych substancji badanych zastosowanie gotowych materiałów może być odpowiednim rozwiązaniem.

1.8.3. **Gleby**

1.8.3.1. *Wybór gleb*

Do określenia szlaków przemian, może być stosowana gleba reprezentatywna, glina piaszczysta, glina iłowa, glina, lub piasek gliniasty (zgodnie z klasyfikacją FAO i USDA (18)), o pH 5,5–8,0, zawartości węgla organicznego 0,5–2,5 % i mikrobiologicznej biomasie stanowiącej co najmniej 1 % całkowitej zawartości węgla organicznego (10).

Do badania tempa przemian powinny zostać użyte przynajmniej trzy dodatkowe gleby reprezentujące szereg istotnych gleb. Te gleby powinny mieć różną zawartość węgla organicznego, pH, zawartość gliny i mikrobiologicznej biomasy (10).

▼B

Wszystkie gleby powinny zostać scharakteryzowane, przynajmniej pod względem tekstury (% piasku, % iłów, % gliny) (zgodnie z klasyfikacją FAO i USDA (18)), pH, pojemności wymiany kationowej, węgla organicznego, gęstości nasypowej, własności retencji wody ([1]) i mikrobiologicznej biomasy (tylko do badań w warunkach natlenienia). Dodatkowe informacje na temat właściwości gleby mogą być przydatne przy interpretacji wyników. Dla określenia własności gleby mogą być stosowane zalecane metody przedstawione w literaturze (19)(20)(21)(22)(23). Mikrobiologiczna biomasa powinna być oznaczona z wykorzystaniem metody respiracji wywołanej przez substrat (SIR) (25)(26) lub metodami alternatywnymi (20).

1.8.3.2. *Pobieranie, przenoszenie i przechowywanie gleb*

Powinny być dostępne szczegółowe informacje na temat historii obszaru, z jakiego została pobrana badana próbka gleby. Szczegółowe informacje powinny obejmować dokładną lokalizację, szatę roślinną, poddawanie działaniu substancji chemicznych, poddawanie działaniu nawozów organicznych i nieorganicznych, dodatki materiałów biologicznych lub inne zanieczyszczenia. Gleby, które były poddawane działaniu substancji badanej lub jej strukturalnych analogów w ciągu ostatnich czterech lat, nie powinny być używane do badania przemian (10)(15).

Gleba powinna być świeżo zebrana z pola (z poziomu A lub z wierzchniej warstwy o grubości 20 cm), z taką zawartością wody, jaka ułatwia przesiewanie. Dla gleb innych niż gleby z pól ryżowych, powinno się unikać pobierania próbek podczas lub bezpośrednio po długich okresach (> 30 dni) suszy, mrozu, zalewania (14). Próbki powinny być transportowane w sposób, który minimalizuje zmiany zawartości wody w glebie oraz powinny być przechowywane w ciemnym miejscu, z możliwie swobodnym dostępem powietrza. Na ogół do tego celu wystarczająca jest luźno związana torba polietylenowa.

Gleba powinna zostać przetworzona możliwie szybko po pobraniu próbki. Roślinność, większe okazy fauny glebowej oraz kamienie powinny zostać usunięte przed przesianiem gleby przez 2 mm sito, które usuwa drobne kamienie, okazy fauny i szczątki roślin. Należy unikać intensywnego suszenia i kruszenia gleby przed przesiewaniem (15).

Jeżeli zimą pobieranie próbek z pola jest trudne (gleba zamarznięta lub pokryta warstwą śniegu), można pobrać próbkę z partii gleby przechowywanej w szklarni pod pokryciem roślinnym (np. trawa lub mieszanina trawy i koniczyny). Zdecydowanie preferuje się badanie gleb świeżo pobranych z terenu, ale jeżeli zebrana i przetworzona gleba musi być przechowywana przed rozpoczęciem badań, przechowywanie musi być w odpowiednich warunkach i tylko przez ograniczony czas (4 ± 2 °C przez maksymalnie trzy miesiące), aby utrzymać aktywność mikrobiologiczną ([2]). Szczegółowe instrukcje pobierania, obchodzenia się i przechowywania gleby, przeznaczonej do eksperymentów z bioprzemianami, można znaleźć w (8)(10)(15)(26)(27).

([1]) Własności retencji wody gleby można zmierzyć jako pojemność połowa, jako pojemność wodna lub jako siła ssąca gleby (pF). Wyjaśnienia zamieszczono w załączniku 1. W sprawozdaniu z badań należy podać, czy własności retencji wody i gęstość nasypową gleb określono w próbkach z terenu niezaburzonego, czy w próbkach zaburzonych (przetworzonych).

([2]) Ostatnie wyniki badań pokazują, że gleby ze stref umiarkowanych również mogą być przechowywane w temp. –20 °C przez okres dłuższy niż trzy miesiące (28)(29) bez znaczących strat aktywności mikrobiologicznej.

▼B

Przed użyciem przetworzonej gleby w tym badaniu, powinna ona być wstępnie inkubowana, aby umożliwić kiełkowanie i usunięcie nasion, i aby przywrócić równowagę metabolizmu mikrobiologicznego następującą po przeniesieniu próbki z pola lub z warunków przechowywania do warunków inkubowania. Na ogół wystarczający jest okres wstępnej inkubacji 2–28 dni, w temperaturze i wilgotności zbliżonych do tych, jakie panują w czasie właściwego badania (15). Czas przechowywania i wstępnej inkubacji łącznie nie powinien przekraczać trzech miesięcy.

1.9. PROWADZENIE BADAŃ

1.9.1. **Warunki badania**

1.9.1.1. *Temperatura badania*

Podczas całego okresu badania gleby powinny być inkubowane w ciemności w stałej temperaturze reprezentatywnej dla warunków klimatycznych, w których wystąpi wykorzystanie lub uwolnienie substancji badanej. Zaleca się temperaturę około 20 ± 2 °C dla wszystkich substancji badanych, jakie mogą przeniknąć do gleby w klimacie umiarkowanym. Temperatura powinna być monitorowana.

Dla substancji chemicznych podawanych lub uwalnianych do gleby w chłodniejszych strefach klimatycznych (np. w krajach północnych, podczas okresów jesieni/zimy) powinno się inkubować dodatkowe próbki gleby, ale w niższej temperaturze (np. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Zawartość wilgoci*

Do badań przemian w warunkach natlenienia powinna zostać skorygowana zawartość wilgoci [1] i powinna być utrzymywana na poziomie pF od 2,0 do 2,5 (3). Zawartość wilgoci jest wyrażana jako masa wody na masę suchej gleby i powinna być regularnie kontrolowana (np. w odstępach dwutygodniowych) przez ważenie kolby inkubacyjnej, a straty wody powinny być kompensowane przez dodawanie wody (najlepiej sterylnie filtrowana woda z kranu). Należy uważać, by uniemożliwić lub zminimalizować straty substancji badanej i/lub produktów transformacji w wyniku ulatniania się i/lub fotodegradacji (jeśli zachodzi) podczas uzupełniania wilgoci.

Do badania przemian w warunkach beztlenowych i dla warunków pól ryżowych, gleba jest nasycana wodą przez zalewanie.

1.9.1.3. *Inkubacja w warunkach tlenowych*

W systemach przepływowych warunki natlenienia będą utrzymane w wyniku przerywanego przepływu cieczy lub ciągłej wentylacji nawilżonym powietrzem. W kolbach biometrycznych wymiana powietrza jest uzyskiwana przez dyfuzję.

1.9.1.4. *Sterylne warunki tlenowe*

Aby uzyskać informacje na temat znaczenia abiotycznej przemiany substancji badanej, próbki gleby mogą zostać wysterylizowane (metody sterylizacji zob. poz. bibliograficzne (16) i (29)), poddawane działaniu sterylnych substancji badanych (np. dodawanie roztworu przez filtr sterylny) i natleniane nawilżonym sterylnym powietrzem zgodnie z opisem w sekcji 1.9.1.3. Dla gleb pod mokre uprawy ryżu gleba i woda powinny być sterylizowane i inkubacja powinna być prowadzona jak opisano w sekcji 1.9.1.6.

[1] Gleba nie powinna być ani za mokra, ani za sucha, aby utrzymać odpowiednie napowietrzenie i odżywienie mikroflory glebowej. Zawartość wilgoci zalecana dla optymalnego wzrostu mikrobiologicznego mieści się z zakresie od 40–60 % zdolności utrzymywania wody (WHC) i 0,1–0,33 bara (6). Ten drugi zakres jest równoważny zakresowi pF 2,0–2,5. Typowe zawartości wilgoci różnych rodzajów gleb są podane w załączniku 2.

▼B

1.9.1.5. *Beztlenowe warunki inkubacji*

Aby stworzyć i utrzymać warunki beztlenowe, gleba jest poddawana działaniu substancji badanej i inkubowana w warunkach natlenienia przez 30 dni lub jeden okres półtrwania lub DT_{50} (w zależności od tego, który jest krótszy), następnie jest zalewana wodą (warstwa 1–3 cm wody nad powierzchnią) i system inkubowania jest przepłukiwany strumieniem gazu obojętnego (np. azot lub argon) ([1]). Układ badawczy musi pozwalać na pomiary takie, jak pH, stężenie tlenu i potencjał redoks oraz zawierać urządzenie do wychwytywania produktów lotnych. Układ biometryczny musi być zamknięty i uniemożliwiać dostawanie się powietrza poprzez dyfuzję.

1.9.1.6. *Warunki inkubacji mokrej uprawy ryżu*

Do badania przemian w warunkach mokrej uprawy ryżu, gleba jest zalewana warstwą wody o grubości warstwy około l–5cm, a substancja badana jest dodawana do fazy wodnej (9). Zaleca się głębokość gleby przynajmniej 5 cm. System jest wentylowany powietrzem, tak jak w warunkach natlenienia. Należy monitorować i podawać pH, stężenie tlenu i potencjał redoks warstwy wody. Niezbędny jest przynajmniej dwutygodniowy okres wstępnej inkubacji przed rozpoczęciem badań przemian (zob. sekcja 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Czas trwania badań*

Czas badania stopnia przemian i ich szlaków nie powinien przekraczać 120 dni ([2]) (3)(6)(8), ponieważ można oczekiwać, że po tym czasie spadnie aktywność mikrobiologiczna w sztucznych warunkach laboratoryjnych izolowanych od naturalnej wymiany składników. Jeżeli jest to konieczne do scharakteryzowania zaniku substancji badanej, a także tworzenia i zaniku głównych produktów przemian, badania mogą być prowadzone w dłuższym okresie czasu (np. 6 lub 12 miesięcy) (8). Powody dłuższej inkubacji powinny zostać przedstawione w sprawozdaniu z badań i powinny być dołączone pomiary biomasy sporządzone podczas i na końcu tego okresu.

1.9.2. **Prowadzenie badań**

Około 50–200 g gleby (w suchej masie) jest umieszczane w każdej kolbie inkubacyjnej (zob. rysunki 1 i 2 w załączniku 3), a następnie gleba jest poddawana działaniu substancji badanej jedną z metod przedstawionych w sekcji 1.8.2. Jeżeli stosowane są rozpuszczalniki organiczne do podania substancji badanej, należy je usunąć z gleby poprzez odparowanie. Następnie gleba jest dokładnie mieszana przy pomocy szpatułki i/lub poprzez wstrząsanie kolby. Jeżeli badanie jest prowadzone w warunkach mokrej uprawy ryżu, gleba z wodą powinny zostać dokładnie wymieszane po dodaniu substancji badanej. Małe podwielokrotności (np. 1 g) gleby poddanej działaniu powinny być analizowane pod kątem substancji badanej w celu sprawdzenia równomiernego rozkładu. Dla metody alternatywnej, zob. poniżej.

([1]) Warunki tlenowe dominują w glebach powierzchniowych i nawet w glebach podpowierzchniowych, jak pokazano w pracy badawczej sponsorowanej przez UE [K. Takagi et al. (1992). Microbial dirersity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environment. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17–21 sierpnia 1992 r., Sigtuna, Szwecja]. Warunki beztlenowe mogą występować jedynie okazjonalnie podczas zalewania gleb po silnych opadach deszczu lub kiedy na polach ryżowych są tworzone warunki ryżowe.

([2]) Badania tlenowe mogą być zakończone przed upływem 120 dni, pod warunkiem że w tym czasie jednoznacznie zostanie osiągnięta ostateczna ścieżka przemiany i ostateczna mineralizacja. Zakończenie badania jest możliwe po 120 dniach lub kiedy zostanie przemienione przynajmniej 90 % substancji badanej, ale tylko wtedy, gdy utworzy się przynajmniej 5 % $C0_2$.

▼B

Stopień poddania działaniu substancji badanej powinien odpowiadać największemu stopniowi podania środka ochrony upraw zalecanemu w instrukcji stosowania i jednorodnemu wprowadzeniu na odpowiednią głębokość na polu (np. górna warstwa 10 cm [1] gleby (7)). Na przykład dla substancji chemicznych stosowanych na liście lub na glebę bez wprowadzania do niej, odpowiednia głębokość do obliczenia, ile substancji chemicznej należy dodać do kolby wynosi 2,5 cm. Dla substancji chemicznych wprowadzanych do gleby, odpowiednia głębokość jest głębokością wprowadzania określoną w instrukcji stosowania. Dla większości substancji chemicznych podawaną ilość należy oszacować na podstawie najbardziej istotnego szlaku wnikania; na przykład jeżeli główny szlak wnikania w glebę prowadzi przez osad ściekowy, substancja chemiczna powinna być dozowana do osadu w stężeniu, które odzwierciedla oczekiwane stężenie w osadzie, a ilość osadu dodawanego do gleby powinna odzwierciedlać zwykłe wprowadzanie osadu do gleby uprawnej. Jeżeli to stężenie nie jest wystarczająco wysokie do zidentyfikowania głównych produktów przemian, pomocna powinna być inkubacja oddzielnej próbki gleby zawierającej wyższe stężenie, należy jednak unikać stężeń, które po przekroczeniu pewnego poziomu wpływają na mikrobiologiczne funkcje w glebie (zob. sekcje 1.5 i 1.8.2).

Alternatywnie, można poddać działaniu substancji badanej większą partię gleby (to jest 1–2 kg), dokładnie mieszając w odpowiednim urządzeniu do mieszania, i następnie przenieść w małych porcjach 50–200 g do kolby inkubacyjnej (na przykład stosując rozdzielacz do próbek). Małe podwielokrotności (np. 1 g) partii gleby poddanej działaniu substancji badanej powinny być analizowane na jej obecność w celu sprawdzenia równomierności rozprowadzenia. Procedura ta jest preferowana, ponieważ umożliwia bardziej równomierne rozprowadzenie substancji badanej w glebie.

Także próbki gleby niepoddane działaniu substancji badanej inkubuje się w tych samych warunkach (natlenienia), jak próbki poddane jej działaniu. Próbki te stosowane są do pomiarów biomasy podczas badań i na ich koniec.

Jeżeli substancja badana podawana jest w postaci rozpuszczonej w rozpuszczalniku (rozpuszczalnikach) organicznym, próbki gleby traktowane taką samą ilością rozpuszczalnika (rozpuszczalników) są inkubowane w tych samych warunkach (natlenienia), jak próbki gleby poddanej działaniu substancji badanej. Te próbki używane do pomiarów biomasy na początku, w trakcie i na końcu badań, w celu określenia wpływu rozpuszczalnika (rozpuszczalników) na biomasę mikrobiologiczną.

Kolby zawierające glebę poddaną działaniu badanej substancji są albo podłączone do systemu przepływowego opisanego na rys. 1, albo zamykane kolumną absorpcyjną przedstawioną na rys. 2 (zob. załącznik 3).

([1]) Obliczenie stężenia początkowego na powierzchni z wykorzystaniem następującego równania:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = Stężenie początkowe stężenie w glebie (mg· kg^{-1}).

A = Podana ilość [kg· ha^{-1}]; 1 = grubość warstwy gleby z pola (m); d = gęstość nasypowa sucha gleby (kg· m^{-3}).

Z reguły podana ilość 1 kg· ha^{-1} powoduje stężenie w glebie około l mg· kg^{-1} w warstwie o grubości 10 cm (przy założeniu gęstości nasypowej 1 g· cm^{-3}).

▼B

1.9.3 **Pobieranie próbek i pomiar**

Dwie kolby inkubacyjne są usuwane w odpowiednich odstępach czasu i próbki gleby są ekstrahowane odpowiednimi rozpuszczalnikami o różnej polarności, a następnie analizuje się ich zawartość pod kątem substancji badanej i/lub produktów przemian. W dobrze zaprojektowanych badaniach jest wystarczająca liczba kolb, tak aby można było poświęcić dwie kolby dla każdego poboru próbek. Także, roztwory absorpcyjne i absorbenty stałe są usuwane w różnych odstępach czasu (co 7 dni przez pierwszy miesiąc, a potem w odstępach 17 dniowych) podczas i na zakończenie inkubacji każdej gleby i analizowane pod kątem produktów lotnych. Poza tym, dla próbki gleby pobranej zaraz po podaniu (próbka z dnia 0) powinno się przygotować przynajmniej 5 dodatkowych punktów pomiarowych. Odstępy czasu powinny być tak dobrane, aby można było określić profil zaniku substancji badanej i profil tworzenia i zaniku produktów przemian (np. 0, 1, 3, 7 dni; 2, 3 tygodnie; 1, 2, 3 miesiące itd.).

Jeżeli stosowane są substancje badane znakowane izotopem ^{14}C, niewyekstrahowane izotopy promieniotwórcze będą kwantyfikowane przy pomocy spalania, a dla każdego odstępu próbkowania będzie obliczany bilans masy.

W przypadkach inkubacji w warunkach beztlenowych i w warunkach mokrej uprawy ryżu faza glebowa i faza wodna są analizowane razem na obecność substancji badanej i produktów przemian lub rozdzielane przy pomocy filtracji lub odwirowania przed ekstrakcją i analizą.

1.9.4 **Badania opcjonalne**

Badania w warunkach natlenienia i braku sterylności w dodatkowym zakresie temperatur i wilgotności gleby mogą być przydatne do oszacowania wpływu temperatury i wilgotności gleby na tempo przemian substancji badanej i/lub produktów przemian w glebie.

Można podjąć próbę dalszej charakteryzacji izotopów promieniotwórczych, które nie uległy ekstrakcji, stosując na przykład ekstrakcję płynem nadkrytycznym.

2. **DANE**

2.1. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Ilości substancji badanej, produktów przemian, substancji lotnych (tylko w %) i nieulegających ekstrakcji powinny zostać podane jako % zastosowanego stężenia początkowego i tam, gdzie to dotyczy, jako $mg \cdot kg^{-1}$ gleby (na podstawie suchej masy gleby) dla każdego odstępu pobierania próbek. Bilans masy należy podać w procencie zastosowanego stężenia początkowego dla każdego odstępu pobierania próbek. Graficzna prezentacja stężenia substancji badanej w zależności od czasu pozwoli na oszacowanie okresu półtrwania lub DT_{50}. Główne produkty przemian powinny zostać zidentyfikowane, a ich stężenia także powinny zostać wykreślone w zależności od czasu, w celu przedstawienia ich tempa powstawania i zaniku. Głównym produktem przemian jest każdy produkt stanowiący >10 % podanej dawki zmierzony w którymkolwiek momencie podczas badań.

Pułapkowane produkty lotne dają pewien wskaźnik odnośnie do potencjału lotności substancji badanej i jej produktów przemian pochodzących z gleby.

▼B

Przez zastosowanie obliczeń z odpowiednim modelem kinetycznym powinno się otrzymać dokładniejsze określenie okresu półtrwania lub wartości DT_{50} i, w miarę potrzeby, wartości DT_{75} i DT_{90}. Okres półtrwania i wartości DT_{50} powinny być podane razem z opisem stosowanej metody, rzędowości kinetyki i współczynnikiem determinacji (r^2). Preferowana jest kinetyka pierwszego rzędu, chyba że $r^2 < 0,7$. Jeśli jest to odpowiednie, obliczenia powinny zostać także wykonane dla głównych produktów przemian. Przykłady odpowiednich modeli są opisane w pozycjach bibliograficznych 31 i 35.

W przypadku badań tempa prowadzonych w różnych temperaturach, tempo przemian powinno zostać opisane w funkcji temperatury dla zakresu temperatur eksperymentu, przy użyciu zależności Arrheniusa w postaci:

$$k = A \times e^{-B/T} \text{ lub } \ln k = 1nA - \frac{B}{T}$$

gdzie ln A i B są stałymi regresji wyznaczonymi odpowiednio z przecięcia i nachylenia najlepszej krzywej dopasowania otrzymanej z regresji liniowej ln k od l/T, k jest stałą tempa reakcji w temperaturze T, gdzie T jest wyrażone w kelwinach. Należy uważać na ograniczony zakres temperatur, w którym spełnione jest równanie Arreheniusa w przypadku przemian zależnych od aktywności mikrobiologicznej.

2.2. OCENA I INTERPRETACJA WYNIKÓW

Choć badania są prowadzone w sztucznych warunkach laboratoryjnych, wyniki pozwolą na ocenę tempa przemian substancji badanej, a także tempa powstawania i zaniku produktów przemian w warunkach panujących w terenie (36)(37).

Badanie szlaków przemian substancji badanej dostarcza informacji o sposobie, w jaki podana substancja zostaje zmieniona pod względem strukturalnym w glebie w wyniku reakcji chemicznych i mikrobiologicznych.

3. **SPRAWOZDANIE**

RAPORT Z BADAŃ

Sprawozdanie z badań musi zawierać:

Substancja badana:

— nazwę zwyczajową, nazwę systematyczną, numer CAS, wzór strukturalny (ze wskazaniem pozycji znacznika(-ów), jeżeli jest zastosowany materiał znakowany izotopowo) oraz odnośne właściwości fizyczno-chemiczne (zob. sekcja 1.5),

— stopień czystości substancji badanej (zanieczyszczenia),

— stopień czystości radiochemicznej znakowanych substancji chemicznych i rodzaj aktywności (w razie potrzeby).

Substancje odniesienia:

— nazwa systematyczna i struktura substancji odniesienia stosowanej do charakteryzacji i/lub identyfikacji produktów przemian.

Badane gleby:

— szczegółowe informacje dotyczące miejsca pobrania,

— data i procedura pobierania próbek gleby,

▼B

— właściwości gleb, takie jak: pH, zawartość węgla organicznego, tekstura (% piasku, % iłu, % gliny), pojemność wymiany kationowej, gęstość nasypowa, własności retencji wody i biomasa mikrobiologiczna,

— długość przechowywania gleby i warunki przechowywania (jeżeli była przechowywana).

Warunki badań:

— daty wykonywania badań,

— ilość podanej substancji badanej,

— stosowane rozpuszczalniki i metoda podawania substancji badanej,

— początkowa masa gleby poddanej działaniu substancji badanej i ilość pobierana do analizy przy każdym odstępie pobierania próbek,

— opis stosowanego systemu inkubacyjnego,

— stopień przepływu powietrza (tylko dla systemu przepływowego),

— temperatura prowadzenia eksperymentu;

— nawilżenie gleby w czasie inkubacji,

— biomasa mikrobiologiczna na początku, w trakcie i na zakończenie badań w warunkach natlenienia,

— pH, stężenie tlenu i potencjał redoks początkowy, w trakcie i na zakończenie badań w warunkach beztlenowych i w warunkach mokrej uprawy ryżu,

— metoda(y) ekstrakcji,

— metody kwantyfikacji i identyfikacji substancji badanej oraz główne produkty przemian w glebie i absorbentach,

— ilość powtórzeń i liczba próbek kontrolnych;

Wyniki:

— wynik oznaczenia aktywności mikrobiologicznej,

— powtarzalność i czułość stosowanych metod analitycznych,

— stopień odzysku (% wartości dla ważnych badań podano w sekcji 1.7.1),

— stabelaryzowane wyniki wyrażone jako % podanej początkowo dawki i w miarę potrzeby, jako mg· kg^{-1} gleby (w suchej masie),

— bilans masowy podczas i na zakończenie badań,

— charakterystyka niepodlegających ekstrakcji (związanych) izotopów lub pozostałości w glebie,

— kwantyfikacja uwolnionego CO_2 i innych lotnych związków,

— wykresy stężeń substancji badanej w glebie w zależności od czasu, w miarę potrzeby, dla głównych produktów przemian,

— okres półtrwania lub DT_{50}, DT_{75} i DT_{90} dla substancji badanej i w miarę potrzeby, dla głównych produktów przemian, włączając w to granice przedziałów ufności,

▼B

— oszacowanie tempa degradacji abiotycznej w warunkach sterylnych,

— ocena kinetyki przemian substancji badanej w miarę potrzeby głównych produktów przemian,

— proponowane szlaki przemian, w miarę potrzeby,

— dyskusja i interpretacja wyników,

— surowe dane (to jest, przykładowe chromatogramy, przykładowe obliczenia tempa przemian i średnie stosowane do identyfikacji produktów przemian).

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Grade Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) Unia Europejska (EU) (1995). Dyrektywa Komisji 95/36/EC z dnia 14 lipca 1995 zmieniająca dyrektywę Rady 91/414/EEC dotyczącą wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin. Załącznik II, część A i załącznik III, część A: Losy i zachowanie się w środowisku.

(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 fur die amtliche Priifung 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 mineralization 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, 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 grade of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Załącznik V do dyrektywy 67/548/EEC.

(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) Metodas of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Strona, 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) Muckenhausen, 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, 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 biotransformation of pesticides in water solution environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 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., Sjodahl-Svensson K, Stenstrom 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, 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, 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, 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., 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, 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, 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, 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, 83–122

▼B

ZAŁĄCZNIK 1

NAPIĘCIE WODY, POJEMNOŚĆ POLOWA GLEBY (FC) I POJEMNOŚĆ WODNA (WHC) ([1])

Wysokość słupa wody (cm)	pF ([a])	bar ([b])	Uwagi
10^7	7	10^4	Sucha gleba
$1,6*10^4$	4,2	16	Początek więdnięcia
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6*10^2$	2,8	0,6	
$3,3*10^2$	2,5	0,33 ([c])	
10^2	2	0,1	Zakres pojemności
60	1,8	0,06	polowej gleby ([d])
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (w przybliżeniu)
1	0	0,001	Gleba nasycona wodą

([a]) pF = log z cm słupa wody.
([b]) 1 bar = 105 Pa.
([c]) Odpowiada przybliżonej zawartości wody 10 % w piasku, 35 % w piasku gliniastym, 45 % w glinie.
([d]) Pojemność polowa nie jest stała, ale zmienia się w zakresie pF od 1,5 do 2,5.

Napięcie wody jest mierzone w cm wysokości słupa wody lub w barach. Z powodu dużego zakresu napięcia kapilarnego jest wyrażane po prostu, jako wartość pF, która jest równoważna logarytmowi cm słupa wody.

Pojemność polowa jest definiowana jako ilość wody, jaka może być przechowywana pomimo grawitacji przez naturalną ziemię przez 2 dni po dłuższym okresie opadów lub po odpowiedniej irygacji. Jest określana w nienaruszonej glebie *in situ* w terenie. Ten pomiar nie może więc być stosowany do naruszonych, laboratoryjnych próbek gleb. Wartości FC oznaczone w naruszonych glebach mogą wykazywać większe odchylenia systematyczne.

Pojemność wodna (WHC) jest wyznaczana w laboratorium przy użyciu nienaruszonej i naruszonej gleby przez nasycanie słupa gleby wodą w wyniku ruchów kapilarnych. Jest to szczególnie użyteczne dla gleb naruszanych i może osiągać wartość do 30 % wyższą niż największa pojemność polowa[8]. Jest też łatwiejsza do wyznaczenia eksperymentalnie, niż rzetelne wyznaczenie wartości FC.

Uwagi

([1]) Muckenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

ZAŁĄCZNIK 2

ZAWARTOŚĆ WILGOCI W GLEBIE (g wody na 100 g suchej gleby) DLA RÓŻNYCH RODZAJÓW GLEB Z RÓŻNYCH KRAJÓW

Wilgotność gleby	Kraj	Rodzaj gleby w danym kraju		
		WHC ([1])	pF = 1,8	pF = 2,5
Piasek	Niemcy	28,7	8,8	3,9
Piasek gliniasty	Niemcy	50,4	17,9	12,1
Piasek gliniasty	Szwajcaria	44,0	35,3	9,2
Glina ilasta	Szwajcaria	72,8	56,6	28,4
Ił gliniasty	Brazylia	69,7	38,4	27,3
Ił gliniasty	Japonia	74,4	57,8	31,4
Glina piaszczysta	Japonia	82,4	59,2	36,0
Glina ilasta	USA	47,2	33,2	18,8
Glina piaszczysta	USA	40,4	25,2	13,3

([1]) pojemność wodna (WHC).

▼B

ZAŁĄCZNIK 3

Rysunek 1

Przykłady aparatury przepływowej do badań związków chemicznych w glebie ([1]) ([2])

1: zawór stożkowy

2: płuczka do gazu zawierająca wodę

3: membrana (tylko w warunkach sterylnych), wielkość porów 0.2 µm

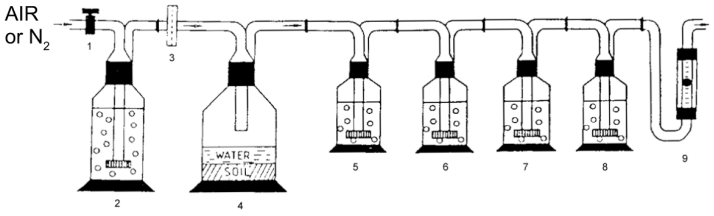
4: kolba do badania metabolizmu gleby (przykryta wodą tylko do warunków beztlenowych i mokrych upraw ryżowych;)

5: pułapka z glikolem etylenowym na lotne związki organiczne

6: pułapka z kwasem siarkowym na lotne związki alkaliczne

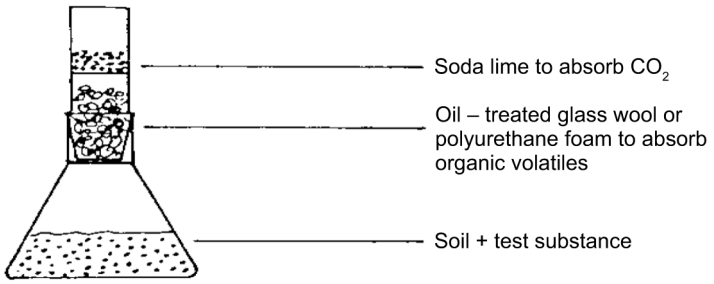
7, 8: pułapka z wodorotlenkiem sodu na CO_2 i inne lotne substancje kwaśne

9: miernik przepływu.



Rysunek 2

Przykład kolby biometrycznej do badań przemian chemicznych w glebie ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 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, 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, 141-146.

▼B

C.24. PRZEMIANY TLENOWE I BEZTLENOWE W UKŁADACH OSADÓW WODNYCH

1. METODA

Ta metoda badawcza jest równoważna z OECD TG 308 (2002).

1.1. WPROWADZENIE

Substancje chemiczne mogą dostawać się do płytkich lub głębokich wód powierzchniowych takimi szlakami, jak bezpośrednie wprowadzenie, znoszenie wód rozpylonych, spływ, odwadnianie, usuwanie odpadów, ścieki przemysłowe, gospodarcze lub rolnicze i opady atmosferyczne. Ta metoda badawcza opisuje metodę laboratoryjną do oceny tlenowej i beztlenowej przemiany organicznych substancji chemicznych w układach osadów wodnych. Jest oparta na istniejących wytycznych (1)(2)(3)(4)(5)(6). Podczas Warsztatów OECD na temat Selekcji Gleb/Osadów, które odbyły się w Belgirate, we Włoszech w 1995 (7), uzgodniono w szczególności liczbę i rodzaj osadów do stosowania w tym badaniu. Podano również zalecenia odnoszące się do pobierania, przenoszenia i przechowywania próbek osadów, oparte na wytycznych ISO (8). Takie badania są wymagane dla substancji chemicznych, które są bezpośrednio wprowadzane do wody lub, co do których istnieje możliwość dostania się do środowiska wodnego poprzez szlaki opisane powyżej.

Warunki w naturalnych układach osadów wodnych są często tlenowe w górnej fazie wodnej. Warstwa powierzchniowa osadu może być zarówno natleniona, jak i niedotleniona, podczas gdy głębsze osady są zazwyczaj beztlenowe. Aby uwzględnić wszystkie te możliwości, w tym dokumencie opisano zarówno badania w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Badanie w warunkach tlenowych symuluje natlenioną kolumnę wodną nad warstwą osadów natlenionych ze stopniowo niedotlenionym podkładem. Badanie w warunkach beztlenowych symuluje całkowicie beztlenowy układ woda-osad. Jeśli okoliczności wskazują, że jest konieczne znaczne odejście od tych zaleceń, na przykład poprzez użycie nienaruszonych rdzeni osadowych lub osadów, które mogły zostać poddane działaniu substancji badanych, dla tych celów są dostępne inne metody (9).

1.2. DEFINICJE

W każdym przypadku należy używać standardowych międzynarodowych jednostek (SI).

Substancja badana: jakakolwiek substancja, czy to związek macierzysty czy też odnośne produkty przemian.

Produkty przemian: wszystkie substancje powstałe w wyniku biotycznych lub abiotycznych reakcji przemian substancji badanej, w tym CO_2 i produkty w pozostałościach związanych.

Pozostałości związane: „Pozostałości związane” stanowią związki w glebie, roślinach lub zwierzętach, które pozostają po ekstrakcji w materiale macierzystym w postaci substancji macierzystej lub jej metabolitu(-ów)/produktów przemiany. Metoda ekstrakcji nie może zmieniać w sposób znaczący samych związków lub struktury materiału macierzystego. Charakter wiązania można częściowo wyjaśnić przez metody ekstrakcji zmieniające materiał macierzysty i wyspecjalizowane techniki analityczne. Do dziś, na przykład, zostały w ten sposób zidentyfikowane wiązania kowalencyjne zjonizowane i sorpcyjne, a także pułapkowanie. Na ogół tworzenie się pozostałości związanych znacząco redukuje biodostępność i bioprzyswajalność (10) [zmodyfikowane w stosunku do IUPAC 1984 (11)].

▼B

Przemiany tlenowe: (utlenianie): reakcje zachodzące w obecności tlenu cząsteczkowego (12).

Przemiany beztlenowe: (redukcja): reakcje zachodzące z wykluczeniem tlenu cząsteczkowego (12).

Wody naturalne: są wodami powierzchniowymi otrzymanymi ze stawów, rzek, strumieni itp.

Osad: jest mieszaniną mineralnych i organicznych składników chemicznych, te drugie zawierające związki o wysokiej zawartości węgla i azotu i o dużych masach cząsteczkowych. Jest osadzony przez wodę naturalną i tworzy z tą wodą granicę rozdziału.

Mineralizacja: to całkowita degradacja związku organicznego do CO_2 i H_2O w warunkach tlenowych lub CH_4, CO_2 i H_2O w warunkach beztlenowych. W kontekście tej metody badawczej, w której stosowane są związki znakowane ^{14}C, mineralizacja oznacza ekstensywną degradację, podczas której znaczone atomy węgla są utleniane z wydzieleniem odpowiedniej ilości $^{14}CO_2$

Czas półtrwania: $t_{0,5}$ to czas potrzebny do przemiany 50 % substancji badanej, jeżeli przemiana może zostać opisana kinetyką pierwszego rzędu; nie zależy od stężenia.

DT_{50} (Czas zaniku 50): to czas, w którym początkowe stężenie substancji badanej zmniejsza się o 50 %.

DT_{75} (Czas zaniku 75): to czas, w którym początkowe stężenie substancji badanej zmniejsza się o 75 %.

DT_{90} (Czas zaniku 90): to czas, w którym początkowe stężenie substancji badanej zmniejsza się o 90 %.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Substancje odniesienia powinny być stosowane do identyfikacji i oznaczenia ilościowego produktów przemian metodami spektroskopowymi i chromatograficznymi.

1.4. INFORMACJE O SUBSTANCJI BADANEJ

Nieznakowane i znakowane izotopowo substancje badane mogą być użyte do pomiaru tempa przemian, chociaż preferowany jest materiał znakowany. Materiał znakowany jest wymagany do badania szlaków przemian i do określenia bilansu masowego. Zaleca się znakowanie izotopem ^{14}C, ale inne izotopy, takie jak ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P, także mogą być użyteczne. Tak, jak to tylko możliwe, znacznik powinien być umiejscowiony w najbardziej stabilnej części(ach) cząsteczki ([1]). Chemiczna lub/i radiochemiczna czystość substancji testowej powinna wynosić co najmniej 95 %.

Przed rozpoczęciem badania powinny być dostępne następujące informacje o substancji badanej:

a) rozpuszczalność w wodzie (metoda A.6),

b) rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych,

c) prężność pary (metoda A.4) i stała proporcjonalności w prawie Henry'ego,

([1]) Na przykład, jeżeli substancja badana zawiera jeden pierścień, wymagane jest znakowanie na tym pierścieniu; jeżeli substancja badana zawiera dwa lub więcej pierścieni, mogą być potrzebne oddzielne badania w celu oceny losu każdego znakowanego pierścienia i w celu otrzymania odpowiednich informacji na temat powstawania produktów przemian.

▼B

d) współczynnik podziału n-oktanol/woda (metoda A.8),

e) współczynnik adsorpcji (odpowiednio K_d, K_f, K_{oc}) (metoda C.18),

f) hydroliza (metoda C.7),

g) stała dysocjacji (pK_a) [OECD Wytyczna 112] (13),

h) struktura chemiczna substancji badanej i pozycja znacznika(ów) izotopowych jeśli dotyczy.

Uwaga: Należy podać temperaturę, w której wykonano te pomiary.

Inne przydatne informacje mogą obejmować dane na temat toksyczności substancji badanej dla mikroorganizmów, dane na temat biodegradalności gotowej i/lub nieodłącznej, oraz dane o tlenowych i beztlenowych przemianach w glebie.

Powinny być dostępne metody analityczne (w tym metody ekstrakcji i czyszczenia) do identyfikacji i oznaczania ilościowego substancji badanej i jej produktów przemian w wodzie i w osadzie (patrz sekcja 1.7.2).

1.5 ZASADA METODY BADAWCZEJ

W opisanej metodzie dla tego badania stosuje się tlenowy i beztlenowy układ osadu wodnego (zobacz załącznik 1), który umożliwia:

(i) pomiar tempa przemiany substancji badanej w układzie woda-osad;

(ii) pomiar tempa przemiany substancji badanej w osadzie;

(iii) pomiar tempa mineralizacji substancji badanej i/lub jej produktów przemiany (gdy stosowana jest substancja badana znakowana izotopem ^{14}C);

(iv) identyfikacja i oznaczenie ilościowe produktów przemiany w fazach wodnej i w osadu, w tym bilans masowy (gdy stosowana jest znakowana substancja badana);

(v) pomiar rozdziału substancji badanej i jej produktów przemiany między dwie fazy podczas okresu inkubacji w ciemności (by uniknąć, na przykład, zakwitu glonów) w stałej temperaturze. Czasy półtrwania, wartości DT_{50}, DT_{75} i DT_{90} są określone, tam gdzie potwierdzają to dane, ale nie powinny być ekstrapolowane daleko poza okres eksperymentalny (zob. sekcja 1.2).

Do badań odpowiednio w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych wymagane są conajmniej dwa osady wraz z towarzyszącymi im wodami (7). Jednakże mogą wystąpić przypadki, gdzie powinny być użyte więcej niż dwa osady wodne, na przykład, dla substancji chemicznych, które mogą być obecne w środowiskach słodkowodnych i/lub morskich.

▼B

1.6. ZASTOSOWANIE BADANIA

Metoda ogólnie może być stosowana dla substancji chemicznych (znakowanych i nieznakowanych izotopowo), dla których jest dostępna metoda analityczna o wystarczającej czułości i dokładności. Może być stosowana do związków słabo lotnych, nielotnych, rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych w wodzie. Badanie nie powinno być stosowane do substancji chemicznych, o wysokiej lotności z wody (np.: fumiganty, rozpuszczalniki organiczne), które nie mogą być zatrzymane w wodzie i/lub osadzie w warunkach eksperymentalnych badania.

Metoda ta została, jak dotąd, zastosowana do badania przemian substancji chemicznych w wodzie słodkiej i osadach, ale w zasadzie może być także zastosowana do układów estuaryjno-morskich. Nie nadaje się do symulacji warunków wód płynących (np. rzek) lub otwartego morza.

1.7. KRYTERIA JAKOŚCIOWE

1.7.1. **Odzysk**

Ekstrakcja i analiza, co najmniej podwójnych próbek wód i osadów natychmiast po dodaniu substancji badanej daje pierwsze wskazanie co do powtarzalności metody analitycznej i jednorodności procedury podawania substancji badanej. Odzysk dla następnych etapów eksperymentu jest podawany przez odnoszący się do nich bilans masowy (gdy stosowane są materiały znakowane). Odzysk powinien mieścić się w zakresie od 90 % do 110 % dla znakowanych substancji chemicznych (6) i od 70–110 % dla nieznakowanych substancji chemicznych.

1.7.2. **Powtarzalność i czułość metody analitycznej**

Powtarzalność metody analitycznej (z wyłączeniem początkowej wydajności ekstrakcji) dla określenia ilości substancji badanej i produktów przemian może być sprawdzona przez powtórzenie analizy tego samego ekstraktu próbek wody lub osadu, które były inkubowane wystarczająco długo, aby wytworzyły się produkty przemian.

Granica wykrywalności (LOD) metody analitycznej dla substancji badanej i dla produktów przemian powinna być na poziomie przynajmniej 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ wody lub osadu (jako substancji badanej) lub 1 % początkowej ilości podanej do układu badanego, w zależności od tego, co jest niższe. Granica kwantyfikacji (LOQ) również powinna zostać określona.

1.7.3. **Dokładność danych przemiany**

Analiza regresji stężeń substancji badanej w funkcji czasu daje właściwe informacje o dokładności krzywej przemian i pozwala na obliczenie granic przedziału ufności dla okresu półtrwania (przy założeniu kinetyki pseudo pierwszego rzędu) lub wartości DT_{50}, oraz w razie potrzeby, wartości DT_{75} i DT_{90}.

1.8. OPIS METODY

1.8.1. **Badany układ i aparatura**

Badanie powinno być przeprowadzone w pojemnikach szklanych (np. butlach, probówkach wirówkowych), chyba że wstępne informacje (jak współczynnik podziału n-oktanol-woda, dane sorpcyjne itp.) pokazują, że badana substancja może przylegać do szkła, w takim przypadku można rozważyć materiał alternatywny (taki jak teflon). Tam gdzie wiadomo, że substancja badana przywiera do szkła, można złagodzić ten problem przez użycie jednej lub więcej następujących metod:

▼B

— określenie masy substancji badanej i produktów przemian sorbowanych do szkła,

— zapewnić mycie rozpuszczalnikiem całego sprzętu szklanego na końcu badania,

— używać produktów gotowych (zobacz też sekcja 1.9.2),

— używać zwiększonej ilości współrozpuszczalnika do dodawania substancji badanej do układu; jeśli jest użyty współrozpuszczalnik, powinien to być współrozpuszczalnik, który nie solwatuje substancji badanej.

Przykłady typowej aparatury badawczej, np.: układy przepływowe i biometryczne są pokazane odpowiednio w załącznikach 2 i 3 (14). Inne użyteczne układy inkubacyjne są opisane w pozycji bibliograficznej 15. Konstrukcja aparatury badawczej powinna umożliwiać wymianę powietrza lub azotu i zatrzymywanie produktów lotnych. Wymiary aparatury muszą być takie, aby spełniały wymagania badania (patrz sekcja 1.9.1). Wentylację można zapewnić albo przez łagodne barbotowanie, albo przez przedmuchiwanie powietrzem lub azotem powierzchni wody. W tym drugim przypadku, wskazane łagodne mieszanie wody od góry może być wskazane dla lepszego rozprowadzenia tlenu lub azotu w wodzie. Nie powinno się używać powietrza pozbawionego CO_2, ponieważ może to powodować wzrost pH wody. W każdym razie zaburzenie osadu jest niepożądane i powinno się go w miarę możliwości unikać. Lekko lotne substancje chemiczne powinny być badane w układzie biometrycznym, z łagodnym mieszaniem powierzchni wody. Można również użyć zamkniętych naczyń z fazą gazową powietrza atmosferycznego lub azotu nad roztworem, z wewnętrznym pojemniczkiem do wyłapywania produktów lotnych (16). Regularna wymiana gazów znad powierzchni roztworu jest wymagana w badaniach tlenowych, żeby skompensować zużycie tlenu przez biomasę.

Odpowiednie pułapki do wyłapywania lotnych produktów przemian obejmują, między innymi, 1 mol· dm^{-3} roztworu wodorotlenku potasu lub wodorotlenku sodu dla ditlenku węgla ([1]) i glikol etylenowy, etanolaminę lub 2 % roztwór parafiny w ksylenie dla związków organicznych. Części lotne powstające w warunkach beztlenowych, takie jak metan, mogą być wyłapywane przez, na przykład, sita molekularne. Takie części lotne mogą być spalone, na przykład do CO_2 poprzez przepuszczanie gazu przez rurę kwarcową wypełnioną CuO w temperaturze 900 °C i wychwytywanie powstałego CO_2 w aparacie absorpcyjnym z alkaliami (17).

Wymagane jest oprzyrządowanie laboratoryjne do analizy chemicznej substancji badanej i produktów przemian (np.: chromatografia gazowo-cieczowa (GLC), wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia cienkowarstwowa (TLC), spektroskopia masowa (MS), chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią masową (GC-MS), chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią masową (LC-MS), magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) itp.), włączając w to układy do wykrywania substancji chemicznych znakowanych i nieznakowanych radioizotopami. Jeśli jest stosowany materiał znakowany radioizotopem, będzie również potrzebny cieczowy licznik scyntylacyjny i aparat do utleniania przez spalanie (do spalania próbek osadów przed analizy promieniotwórczości).

W miarę potrzeby wymagane jest inne standardowe wyposażenie laboratoryjne do oznaczeń fizykochemicznych i biologicznych (zob. sekcja tabela 1, sekcja 1.8.2.2), szkło laboratoryjne, substancje chemiczne i odczynniki.

([1]) Ponieważ te zasadowe roztwory absorpcyjne pochłaniają również ditlenek węgla z wentylacji powietrzem i utworzony przez respirację w doświadczeniach tlenowych, muszą być regularnie wymieniane, aby uniknąć ich nasycenia, a tym samym utraty zdolności absorpcyjnej.

▼B

1.8.2. **Wybór i liczba osadów wodnych.**

Miejsca pobierania próbek powinny być wybierane stosownie do celu badania w dowolnej sytuacji. Przy wyborze miejsc pobierania próbek należy uwzględnić historię ewentualnych rolniczych, przemysłowych i gospodarczych wpływów na zlewnię i wody w górze rzeki. Osady nie powinny być użyte, jeśli zostały zanieczyszczone substancją badaną lub jej analogami strukturalnymi w ciągu ostatnich czterech lat.

1.8.2.1. *Wybór osadów*

Zazwyczaj używa się dwóch osadów do badań w warunkach tlenowych (7). Dwa wybrane osady powinny się różnić pod względem zawartości węgla organicznego i budowy. Jeden osad powinien mieć wysoką zawartość węgla organicznego (2,5–7,5 %) i budowę drobnoziarnistą, drugi osad powinien mieć niską zawartość węgla organicznego (0,5–2,5 %) i budowę gruboziarnistą. Różnica zawartości węgla organicznego powinna zazwyczaj wynosić co najmniej 2 %. „Budowa drobnoziarnista" jest zdefiniowana jako suma [glina +ił] ([1]) o zawartości > 50 % a „budowa gruboziarnista" jest zdefiniowana jako suma [glina + ił] o zawartości < 50 %. Różnica zawartości [glina + ił] dla tych dwóch osadów powinna zwykle wynosić co najmniej 20 %. W przypadku gdy substancja chemiczna może także dostać się do wody morskiej, przynajmniej jeden z układów woda-osad powinien być pochodzenia morskiego.

Dla badań w warunkach ściśle beztlenowych, dwa osady (wraz z towarzyszącymi wodami) powinny być pobrane ze stref beztlenowych powierzchniowych części wód (7). Obie fazy osadowa i wodna powinny być przenoszone i transportowane ostrożnie bez dostępu tlenu.

Przy wyborze osadów mogą być ważne inne parametry i powinny być rozpatrywane dla każdego przypadku indywidualnie. Na przykład zakres pH osadów byłby ważny dla badania substancji chemicznych, których przemiana i/lub sorpcja mogą być zależne od pH. Zależność sorpcji od pH może być odzwierciedlone w wartości pK_a substancji badanej.

1.8.2.2. *Charakterystyka próbek woda-osad*

Kluczowe parametry, które muszą być zmierzone i podane w sprawozdaniu (w odniesieniu do użytej metody) zarówno dla wód, jak i osadów, oraz etap badania, na którym te parametry powinny zostać określone, są podsumowane w tabeli poniżej. Dla informacji, metody określania tych parametrów są podane w bibliografii (18)(19)(20)(21).

Dodatkowo może zachodzić potrzeba pomiaru i sprawozdania innych parametrów stosownie do indywidualnego przypadku (np.: dla wody słodkiej: cząstki zawieszone, zasadowość, twardość, przewodnictwo, NO_3/PO_4 (stosunek i wartości bezwzględne); dla osadów: zdolność wymiany kationowej, pojemność wodna, węglany, całkowity azot i fosfor; a dla układów morskich: zasolenie). Analiza osadów i wody na azotany, siarczany, żelazo bioprzyswajalne i ewentualnie inne akceptory elektronowe, również może być przydatna do oceny warunków redoks, szczególnie w odniesieniu do przemian beztlenowych.

([1]) [Glina i ił] jest frakcją mineralną osadu o ziarnistości < 50 μm

▼B

Pomiar parametrów do charakteryzacji próbek woda-osad (7)(22)(23)

Parametr	Etap procedury					
	pobieranie próbek w terenie	późniejsze przeno-szenie	początek przygoto-wania	początek badania	podczas badania	koniec badania
Woda						
Pochodzenie/źródło	x					
Temperatura	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Stężenie O_2 (*)	x		x	x	x	x
Potencjał redoks (*)			x	x	x	x
Osad						
Pochodzenie/źródło	x					
Głębokość warstwy	x					
pH		x	x	x	x	x
Rozkład wielkości cząstek		x				
TOC		x	x	x		x
Biomasa mikrobiologiczn a (**)		x		x		x
Potencjał redoks (*)	Obser-wacja (kolor/ zapach)		x	x	x	x

(*) Ostatnie badania pokazują, że pomiary stężeń tlenu w wodzie i potencjałów redoks nie mają ani mechanistycznej, ani predykcyjnej wartości, tak długo, jak zaburzony jest wzrost i rozwój populacji mikrobiologicznej w wodach powierzchniowych (24)(25). Oznaczenie zapotrzebowania na tlen biochemiczny (BOD, przy pobieraniu próbek w terenie, na początku i na końcu badania) i stężeń mikro/makro składników biogennych Ca, Mg i Mn (na początku i na końcu badania) w wodzie i pomiar całkowitego N i całkowitego P (przy pobieraniu próbek w terenie i na końcu badania) może być lepszym narzędziem do interpretacji i oceny tempa bioprzemian tlenowych i ich szlaków.

(**) Metoda tempa respiracji mikrobiologicznej (26), metoda zadymiania (27) lub zliczanie na podkładzie rozmnożeniowym (np. bakterie, promieniowce, grzyby i całe kolonie) dla badań w warunkach tlenowych; tempo metanogenezy dla badań beztlenowych.

1.8.3. **Pobieranie, przenoszenie i przechowywanie**

1.8.3.1. *Pobieranie*

Przy pobieraniu próbek osadu należy korzystać z projektu wytycznych ISO o pobieraniu próbek osadu dennego (8). Próbki osadu powinny być pobierane z całej górnej warstwy osadu, o grubości od 5 do 10 cm. Towarzysząca mu woda powinna być pobrana z tego samego miejsca lub lokalizacji i w tym samym czasie, co osad. Dla badań w warunkach beztlenowych osad i towarzysząca woda powinny być pobrane i transportowane bez dostępu tlenu (28) (zob. sekcja 1.8.2.1). Niektóre urządzenia do pobierania próbek są opisane w literaturze (8)(23).

▼B

1.8.3.2. *Przenoszenie*

Osad jest oddzielany od wody przez filtrację i przesiewany na mokro przez 2 mm sito przy użyciu nadmiaru miejscowej wody, która jest potem wylewana. Następnie, znane ilości osadów i wody są mieszane z pożądaną prędkością (zob. sekcja 1.9.1) w kolbach inkubacyjnych przez okres przystosowawczy (zob. sekcja 1.8.4). Dla badań w warunkach beztlenowych wszystkie kroki na etapie przenoszenia muszą być wykonane bez dostępu tlenu (29)(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3. *Przechowywanie*

Bardzo zaleca się użycie świeżo pobranego osadu, jeśli jednak konieczne jest jego przechowywanie, osad i woda powinny być przesiane, jak opisano powyżej i przechowywane razem, zalane wodą (6–10 cm warstwy wody), w ciemności, w temperaturze 4 ± 2 °C[4] przez maksymalnie 4 tygodnie (7)(8)(23). Próbki przeznaczone do badań w warunkach tlenowych powinny być przechowywane przy swobodnym dostępie powietrza (np.: w otwartych pojemnikach), natomiast próbki do badań beztlenowych, bez dostępu tlenu. Podczas transportu i magazynowania nie może zajść zamrożenie osadu i wody i wysuszenie osadu.

1.8.4. **Przygotowanie próbek osad/woda do badania**

Okres przystosowawczy powinien nastąpić przed dodaniem substancji badanej, gdzie każda próbka osad/woda jest umieszczana w naczyniu inkubacyjnym, do użycia w badaniu głównym, i przystosowanie powinno być prowadzone dokładnie w tych samych warunkach, co inkubacja (zob. sekcja 1.9.1). Okres przystosowawczy jest to czas potrzebny do osiągnięcia przez układ umiarkowanej stabilności, co odzwierciedla pH, stężenie tlenu w wodzie, potencjał redoks osadu i wody, oraz makroskopowa separacja faz. Okres przystosowawczy powinien zazwyczaj trwać od jednego do dwóch tygodni i nie powinien przekroczyć czterech tygodni. Wyniki oznaczeń wykonanych w tym okresie powinny zostać podane w sprawozdaniu.

1.9. PROWADZENIE BADAŃ

1.9.1. **Warunki badania**

Badanie powinno być wykonane w aparaturze inkubacyjnej (patrz sekcja 1.8.1) przy stosunku wody do osadu na poziomie między 3:1 a 4:1, oraz grubością warstwy osadu 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]). Zaleca się minimalną ilość 50 g osadu (w suchej masie) na naczynie inkubacyjne.

Badanie powinno być wykonane w ciemności, w stałej temperaturze z przedziału 10–30 °C. Właściwa jest temperatura (20 ± 2) °C. W razie potrzeby, można rozważyć, stosownie do indywidualnego przypadku, dodatkową niższą temperaturę (np. 10 °C), zależnie od informacji wymaganych od badania. Temperatura inkubacji powinna być monitorowana i podana w sprawozdaniu.

([1]) Ostatnie badania pokazały, że przechowywanie w temp. 4 °C może prowadzić do spadku zawartości węgla organicznego w osadzie, co może ewentualnie skutkować spadkiem aktywności mikrobiologicznej. (34)

▼B

1.9.2. **Obróbka i podanie substancji badanej**

Używane jest jedno badane stężenie substancji chemicznej ([1]). Dla środków ochrony upraw wprowadzanych bezpośrednio do części wód, należy przyjąć maksymalną dawkę na etykiecie, jako maksymalny stopień podania obliczony na podstawie pola powierzchni wody w naczyniu do badania. W innych przypadkach, użyte stężenie powinno być oparte na przewidywaniach emisji środowiskowych. Należy uważać, aby zapewnić, że zastosowane będzie odpowiednie stężenie substancji badanej, żeby scharakteryzować szlak przemian oraz powstawanie i zanik produktów przemian. Może być konieczne zastosowanie większych dawek (np.: 10 razy) w sytuacjach, w których stężenia substancji badanej są bliskie granicy wykrywalności na początku badania i/lub w których główne produkty przemian nie mogą być łatwo wykryte, jeżeli są obecne w ilości 10 % stopnia podania substancji badanej. Jednakże jeśli używa się wyższych stężeń testowych, nie powinny one mieć znaczącego niekorzystnego wpływu na aktywność mikrobiologiczną układu woda-osad. Żeby osiągnąć stałe stężenie substancji badanej w naczyniach o różnych wymiarach, można uznać za stosowne korektę ilości podanego materiału, na podstawie wysokości słupa wody w naczyniu w stosunku do głębokości wody w terenie (którą przyjmuje się jako 100 cm, ale mogą być użyte inne głębokości). Zob. załącznik 4 w celu uzyskania przykładowych obliczeń.

W idealnym przypadku substancja badana powinna być podana jako roztwór wodny do fazy wodnej układu badanego. Jeśli nie da się tego uniknąć, użycie małych ilości mieszających się z wodą rozpuszczalników (takich jak aceton, etanol) jest dopuszczalne dla podania i rozprowadzenia substancji badanej, ale nie powinno przekroczyć 1 % v/v i nie powinno mieć niekorzystnego wpływu na aktywność mikrobiologiczną układu badanego. Należy zachować ostrożność przy wytwarzaniu roztworu wodnego substancji badanej – może być właściwe użycie kolumn do wytwarzania i wstępnego mieszania, aby zapewnić kompletną homogeniczność. Po dodaniu roztworu wodnego do układu badanego zaleca się delikatne mieszanie fazy wodnej, aby możliwie najmniej zaburzyć osad.

Nie zaleca się rutynowego używania gotowych produktów, jako że składniki preparatu mogą wywierać wpływ na rozdział substancji badanej i/lub produktów przemian pomiędzy fazę wodną a osad. Jednakże dla substancji badanych o niskiej rozpuszczalności w wodzie zastosowanie produktów gotowych może być właściwym rozwiązaniem.

Liczba naczyń inkubacyjnych zależy od tego, ile razy są pobierane próbki (zob. sekcja 1.9.3). Należy uwzględnić wystarczającą liczbę układów badanych, tak żeby przy każdorazowym pobraniu próbek można było poświęcić dwa układy. Jeżeli stosuje się układy kontrolne wodnego układu osadowego, nie powinny być ona poddawane działaniu substancji badanej. Układy kontrolne mogą być użyte do oznaczenia biomasy mikrobiologicznej osadu i całkowitego węgla organicznego w wodzie i osadzie na końcu badania. Dwa z układów kontrolnych (np. jeden układ kontrolny każdego osadu wodnego) mogą być stosowane do monitorowania wymaganych parametrów w osadzie i w wodzie podczas okresu przystosowawczego (zob. tabela w sekcji 1.8.2.2). Dwa dodatkowe układy kontrolne muszą być uwzględnione w przypadku, gdy substancja badana jest podana przy pomocy rozpuszczalnika, aby zmierzyæ niekorzystne skutki dla aktywności mikrobiologicznej układu badanego.

([1]) Badanie z drugim stężeniem może być przydatne dla substancji chemicznych, które przechodzą do wód powierzchniowych innymi szlakami wejścia, powodujących znacznie inne stężenia, pod warunkiem, że niższe stężenie może być analizowane z wystarczającą dokładnością.

▼B

1.9.3. **Czas badania i pobieranie próbek**

Eksperyment badawczy nie powinien zazwyczaj trwać dłużej niż 100 dni (6) i powinien być kontynuowany tak długo, aż zostanie określony szlak degradacji i model rozkładu woda/osad lub kiedy 90 % substancji badanej zaniknie poprzez przemiany i/lub parowanie. Liczba pobrań próbek powinna wynosić co najmniej sześć (włączając czas zerowy), z opcjonalnym wstępnym badaniem (zob. sekcja 1.9.4) stosowanym do ustalenia właściwego reżimu pobierania próbek i czasu trwania badania, chyba że dostępne są wystarczające dane o substancji badanej z poprzednich badań. Dla hydrofobowych substancji badanych mogą być konieczne dodatkowe punkty pobierania próbek podczas początkowego okresu badania, w celu określenia stopnia rozdziału między fazę wodną a osadową.

We właściwych momentach pobierania próbek całe naczynia inkubacyjne (w powtórzeniach) usuwa się do analizy. Osad i woda znad niego są analizowane osobno ([1]). Należy ostrożnie usunąć wodę powierzchniową, żeby jak najmniej zaburzyć osad. Ekstrakcja i scharakteryzowanie substancji badanej i produktów przemian powinno nastąpić po właściwych procedurach analitycznych. Należy uważać przy usuwaniu materiału, który mógł zostać zaadsorbowany do naczynia inkubacyjnego, albo do łączących rur stosowanych do wyłapania części lotnych.

1.9.4. **Opcjonalne wstępne badanie**

Jeśli czas trwania i reżim pobierania próbek nie mogą być oszacowane na podstawie innych odnośnych badań substancji badanej, można uznać za stosowne opcjonalne wstępne badanie, które powinno być przeprowadzone przy użyciu tych samych warunków badania, jakie zostały zaproponowane do badania ostatecznego. Odnośne warunki doświadczalne i wyniki z badania wstępnego, jeśli je przeprowadzono, powinny być pokrótce przedstawione w sprawozdaniu.

1.9.5. **Pomiary i analizy**

Przy każdym pobieraniu próbek stężenie substancji badanej i produktów przemiany w wodzie i osadzie powinno być zmierzone i podane w sprawozdaniu (jako stężenie i jako procent całości dostarczonej). Generalnie, produkty przemian wykryte przy ≥ 10 % zastosowanej radioaktywności w całym układzie woda-osad przy każdorazowym pobieraniu próbek powinny zostać zidentyfikowane, chyba że można przedstawić rozsądne uzasadnienie braku potrzeby identyfikacji. Produkty przemian, których stężenie ciągle wzrasta podczas badania, również powinny być uwzględnione do identyfikacji nawet, jeśli ich stężenia nie przekraczają granic podanych wyżej, jako że może to wskazywać na trwałość. To drugie powinno być rozpatrywane indywidualnie, stosownie do przypadku, z uzasadnieniem przedstawionym w sprawozdaniu.

Wyniki z układu wychwytującego gazy/części lotne (CO_2 i inne, np.: lotne związki organiczne) powinny być podawane przy każdym pobieraniu próbek. Należy podać w sprawozdaniu tempo mineralizacji. Pozostałości w osadzie nieulegające ekstrakcji (związane) powinny być podawane przy każdym pobieraniu próbek.

([1]) W przypadkach gdy może łatwo wystąpić gwałtowne ponowne utlenianie produktów przemian beztlenowych, podczas pobierania próbek i analizy należy utrzymywać warunki beztlenowe.

▼B

2. **DANE**

2.1. OBRÓBKA WYNIKÓW

Całkowity bilans masy lub odzysk (zob. sekcja 1.7.1) dodanych radioizotopów ma być obliczany przy każdorazowym pobieraniu próbek. Wyniki powinny być podawane jako procent dodanych radioizotopów. Rozdział izotopów między wodę a osad należy podać jako stężenia i procenty, przy każdym pobieraniu próbek.

Czas półtrwania, DT_{50}, i w razie potrzeby, DT_{75} i DT_{90} substancji badanej powinny być obliczone wraz z ich granicami przedziału ufności (zob. sekcja 1.7.3). Informacje o szybkości rozpraszania substancji badanej w wodzie i osadzie można otrzymać poprzez użycie odpowiednich narzędzi oceny. Mogą to być zastosowania kinetyki pseudo pierwszego rzędu, empiryczne techniki dopasowania krzywych, które stosują rozwiązania graficzne lub numeryczne i wiele bardziej złożonych ocen z wykorzystaniem, na przykład, modeli jedno- lub wieloprzedziałowych. Dalsze szczegółowe informacje można otrzymać z odnośnych publikacji (35)(36)(37).

Wszystkie podejścia mają swoje słabe i mocne strony i znacznie się różnią w swojej złożoności. Założenie kinetyki pierwszego rzędu może być zbytnim uproszczeniem procesów degradacji i rozdziału, ale tam, gdzie jest to możliwe daje termin (stała tempa lub czas półtrwania), który jest łatwo zrozumiały i o wartości w modelowaniu symulacyjnym i obliczeniach przewidywanych stężeń środowiskowych. Podejścia empiryczne lub przemiany liniowe mogą dawać lepsze dopasowanie krzywych do danych i dlatego pozwalają na lepsze oszacowanie czasów półtrwania, DT_{50} i, w razie potrzeby, wartości DT_{75} i DT_{90}. Użycie wyprowadzonych stałych jest jednak ograniczone. Modele przedziałowe mogą wytwarzać wiele użytecznych stałych o wartości w ocenie ryzyka, które opisują tempo degradacji w różnych przedziałach i rozdział substancji chemicznej. Powinny być one również użyte do oszacowania stałych tempa dla powstawania i degradacji głównych produktów przemian. We wszystkich przypadkach wybrana metoda musi być uzasadniona i osoba badająca powinna przedstawić graficznie i/lub statystycznie zgodność wyników doświadczenia z przewidywaniami.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1 SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie musi zawierać następujące informacje:

Substancja badana:

— nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna, numer CAS, wzór strukturalny (wskazujący pozycję znacznika (znaczników), jeśli użyty jest materiał znakowany izotopowo) i odnośne właściwości fizyczno- chemiczne,

— czystość (zanieczyszczenia) substancji badanej,

— radiochemiczna czystość znakowanej substancji chemicznej i aktywność molowa (w razie potrzeby).

▼B

Substancje odniesienia:

— nazwa chemiczna i struktura substancji odniesienia użytej do scharakteryzowania i/lub identyfikacji produktów przemian

Badany osad i wody:

— lokalizacja i opis miejsca (miejsc) pobierania próbek wodnego osadu, z uwzględnieniem, jeśli to możliwe, historii zanieczyszczenia,

— wszystkie informacje odnoszące się do pobierania, przechowywania (jeśli było) i przystosowania układów woda-osad,

— charakterystyka próbek woda-osad wymieniona w tabeli w sekcji 1.8.2.2.

Warunki badania:

— zastosowany układ badawczy (np. przepływ, biometr, sposób wentylacji, metoda mieszania, poziom wody, masa osadu, grubość zarówno warstwy wody, jak i osadu, wymiary naczyń do badań itp.)

— podanie substancji badanej do układu badanego: użyte stężenie badane, liczba powtórzeń i sposób kontroli podawania substancji badanej (np.: ewentualne użycie rozpuszczalnika), itp.,

— temperatura inkubacji,

— ilość razy pobierania próbek,

— metody ekstrakcji i wydajności, tak jak i metody analityczne i granice wykrywalności,

— metody charakterystyki/identyfikacji produktów przemiany,

— odchylenia od protokołu badawczego lub warunków badania podczas badania.

Wyniki:

— nieobrobione dane liczbowe analiz reprezentatywnych (wszystkie nieobrobione dane muszą być przechowywane w archiwum GLP),

— powtarzalność i czułość zastosowanych metod analitycznych,

— stopień odzysku (wartości procentowe dla ważnego badania są podane w sekcji 1.7.1),

— tabele wyników wyrażone, jako % dostarczonej dawki i w $mg \cdot kg^{-1}$ w wodzie, osadzie i całkowitym układzie (tylko w %) dla substancji badanej i w razie potrzeby dla produktów przemian i izotopów nieulegających wyekstrahowaniu,

— bilans masowy podczas i na koniec badań,

— graficzne przedstawienie przemian we frakcjach wody i osadu oraz w całym układzie (wraz z mineralizacją),

— tempo mineralizacji,

▼B

— czas półtrwania, DT_{50} i w razie potrzeby wartości DT_{75} i DT_{90} dla substancji badanej i, jeżeli jest to właściwe, dla głównych produktów przemian w wodzie, w osadzie i w całym układzie, wraz z granicami przedziałów ufności,

— ocena kinetyki przemiany substancji badanej i w razie potrzeby głównych produktów przemian,

— proponowany szlak przemian, w razie potrzeby,

— dyskusja wyników.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(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. pp 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, 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, 631–637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with 14C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661–667.

(18) Black, C.A. (1965). Metodas of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Metodas for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Metodas and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 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, 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, 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, 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), 13–21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General metoda for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 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, 1527–1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499–1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A partia test for assessing the mineralisation of 14C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 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, 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, 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, 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, pp. 1349–1354.

▼B

ZAŁĄCZNIK 1

WYTYCZNE DLA UKLADÓW BADAWCZYCH W WARUNKACH TLENOWYCH I BEZTLENOWYCH

Układ badań w warunkach tlenowych

Układ badań w warunkach tlenowych opisany w tej metodzie badawczej składa się z natlenionej warstwy wody (typowe stężenie tlenu w zakresie 7 do 10 $mg \cdot l^{-1}$) i z warstwy osadu, natlenionej na powierzchni i beztlenowej poniżej powierzchni (typowy średni potencjał redoks (E_h) w strefie beztlenowej osadu w zakresie od - 80 do - 190 mV). Nawilżone powietrze przechodzi nad powierzchnią wody w każdym urządzeniu do inkubacji, aby utrzymać wystarczającą ilość tlenu w przestrzeni nad roztworem.

Układ badań w warunkach beztlenowych

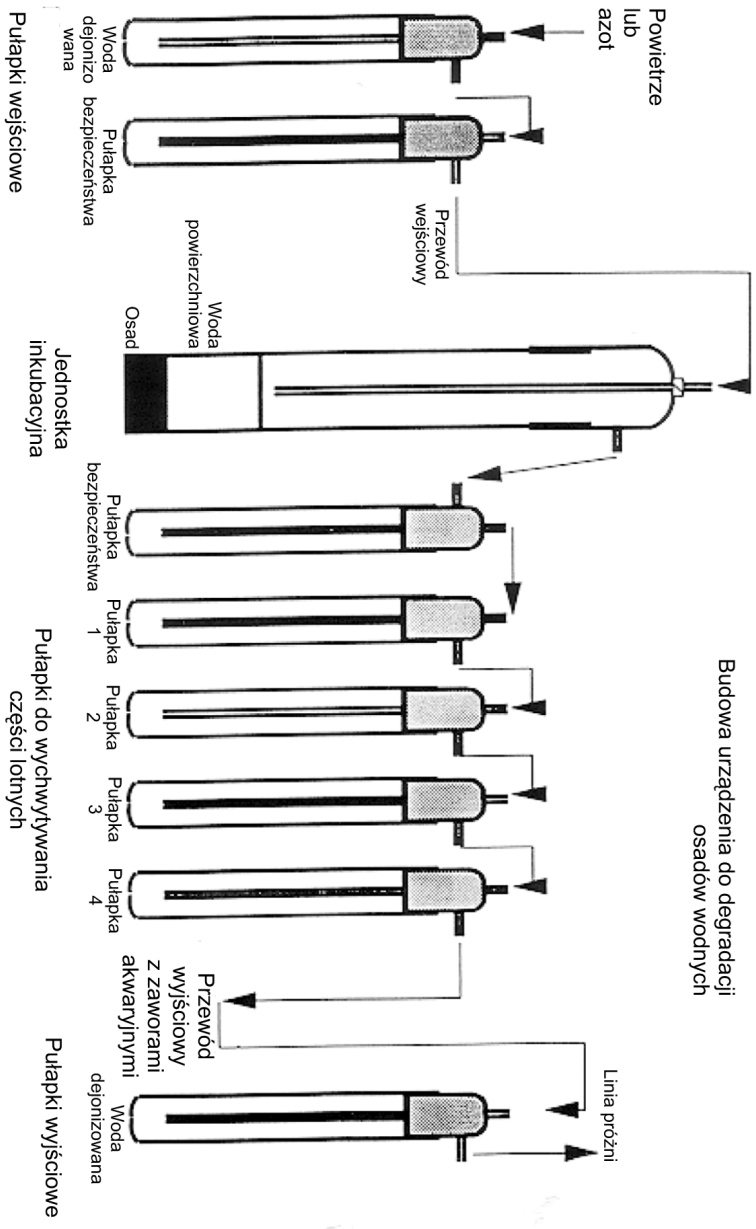
Dla układu badań w warunkach beztlenowych procedura badawcza jest zasadniczo taka sama, jak przedstawiono dla układów tlenowych z tym, że nawilżony azot przepływa nad powierzchnią wody w każdym urządzeniu inkubacyjnym, aby utrzymać atmosferę azotową w przestrzeni nad roztworem. Osad i woda są uważane za beztlenowe, jeśli potencjał redoks (E_h) jest niższy niż - 100 mV.

W badaniu w warunkach beztlenowych ocena mineralizacji obejmuje pomiar wydzielonego ditlenku węgla i metanu.

▼B

ZAŁĄCZNIK 2

PRZYKŁAD APARATURY PRZEPŁYWOWO-GAZOWEJ

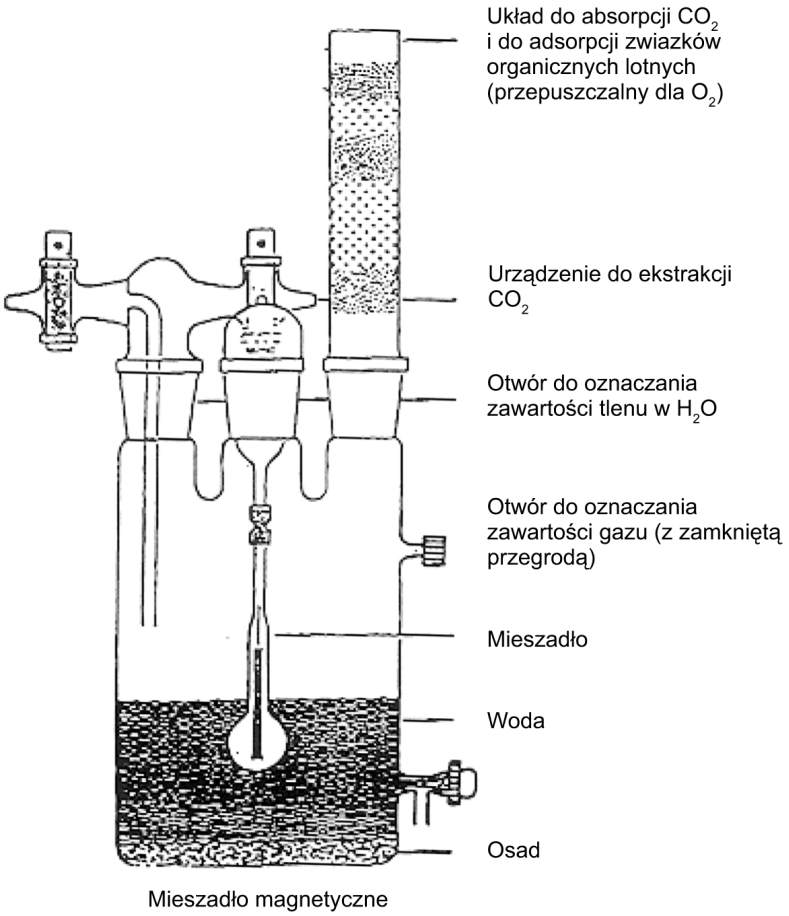


Pułaka bezpieczeństwa, pusta
Pułapka 1:
glikol etylowy do chwytania organicznych części lotnych
Pułapka 2:
kwas siarkowy o stęż. 0,1 M do chwytania zasadowych części lotnych
Pułapki 3 i 4:
wodorotlenek sodowy o stęż. 2 M do chwytania CO_2 i innych kwaśnych części lotnych

▼B

ZAŁĄCZNIK 3

PRZYKŁADY APARATURY BIOMETRYCZNEJ



▼B

ZAŁĄCZNIK 4

PRZYKŁADOWE OBLICZENIA DLA DAWKI DOSTARCZANEJ DO NACZYŃ BADAWCZYCH

Wewnętrzna średnica cylindra:	= 8 cm
Wysokość słupa wody bez osadu:	= 12 cm
Pole powierzchni: 3,142 × 42	= 50,3 cm^2
Stopień dostarczania: 500 g substancji badanej/ha odpowiada 5 µg/cm^2	
Dawka całkowita µg: 5 × 50,3	= 251,5 µg
Korekta ilości w odniesieniu do głębokości 100 cm: 12 × 251,5 ÷ 100	= 30,18 µg
Pojemność słupa wody: 50,3 × 12	= 603 ml
Stężenie w wodzie: 30,18 ÷ 603	= 0,050 µg/ml lub 50 µg/l

▼M1

C.25. MINERALIZACJA TLENOWA W WODZIE POWIERZCHNIOWEJ — SYMULACYJNE BADANIE BIODEGRADACJI

1. METODA

Niniejsza metoda odpowiada OECD TG 309 (2004) (1).

1.1. WSTĘP

Celem niniejszego badania jest zmierzenie czasowego przebiegu biodegradacji badanej substancji w małym stężeniu w napowietrzonej naturalnej wodzie oraz ilościowe wyrażenie wyników obserwacji w postaci wyrażeń szybkości w ujęciu kinetycznym. Niniejsze badanie symulacyjne jest laboratoryjną próbą prowadzoną w systemie okresowym, opartą na metodzie wstrząsanej kolby, mającą na celu wyznaczenie szybkości tlenowej biodegradacji substancji organicznych w próbkach naturalnej wody powierzchniowej (słodkiej, słonawej lub morskiej). Jest ono oparte na ISO/DIS 14592–1 (2) i zawiera również elementy zaczerpnięte w metod badawczych C.23 i C.24 (3)(4). Ewentualnie, przy długich czasach badania, prowadzenie badania w systemie okresowym zastępuje się prowadzeniem go w systemie półciągłym, aby nie dopuścić do pogorszenia się stanu mikrokosmosu. Zasadniczym celem symulacji jest określenie mineralizacji badanej substancji w wodzie powierzchniowej, przy czym mineralizacja stanowi podstawę do wyrażenia kinetyki degradacji. Jednakże dodatkowym drugorzędnym celem badania jest uzyskanie informacji o pierwotnej degradacji oraz informacji o głównych produktach przemiany. Identyfikacja produktów przemiany oraz, jeśli to możliwe, ilościowe określenie ich stężeń, są szczególnie ważne w przypadku substancji, które bardzo wolno ulegają mineralizacji (np. przy półokresach zaniku dla całkowitego szczątkowego ^{14}C przekraczających 60 dni). Z powodu ograniczeń analitycznych do identyfikacji i ilościowego oznaczania głównych produktów przemiany zwykle należy używać wyższych stężeń badanej substancji (np. > 100 μg/l).

Niskie stężenie w niniejszym badaniu oznacza stężenie (np. mniejsze niż 1 μg/l — 100 μg/l), które jest na tyle niskie, iż zapewnia, że kinetyka biodegradacji uzyskana w badaniu odzwierciedla kinetyki spodziewane w środowisku. W stosunku do całkowitej masy ulegających biodegradacji substratów węglowych dostępnych w naturalnej wodzie użytej do badania badana substancja obecna w niskim stężeniu posłuży jako drugorzędny substrat. Oznacza to, że spodziewana kinetyka biodegradacji jest kinetyką pierwszego rzędu („nierosnącą") i że badana substancja może ulegać degradacji poprzez „kometabolizm". Kinetyka pierwszego rzędu oznacza, iż szybkość degradacji (mg/l/dzień) jest proporcjonalna do stężenia substratu, które maleje w czasie. W przypadku rzeczywistej kinetyki pierwszego rzędu właściwa stała szybkości degradacji, k, jest niezależna od czasu i stężenia. Oznacza to, że k nie zmienia się znacząco w trakcie przebiegu doświadczenia i nie zmienia się wraz ze zwiększeniem stężenia pomiędzy doświadczeniami. Z definicji stała właściwej szybkości degradacji jest równa względnej zmianie stężenia przez czas $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Choć w zaleconych warunkach zwykle spodziewane są kinetyki pierwszego rzędu, to mogą istnieć pewne sytuacje, w których bardziej odpowiednie są inne kinetyki. Odchylenia od kinetyki pierwszego rzędu można obserwować np. wówczas, jeżeli szybkość biotransformacji jest ograniczana przez zjawiska związane z transportem masy, takie jak szybkość dyfuzji, a nie przez szybkość reakcji biologicznej. Jednakże dane można niemal zawsze opisać przy pomocy kinetyki pseudo pierwszego rzędu, przyjmując stałą szybkości zależną od stężenia.

▼M1

Przed badaniem należy dysponować danymi o podatności na biodegradację badanej substancji w wyższych stężeniach (np. uzyskanymi ze standardowych prób przesiewowych), jak również danymi o podatności na degradację abiotyczną, produktach przemian oraz istotnych własnościach fizykochemicznych, w celu umożliwienia przeprowadzenia planowania doświadczeń oraz interpretacji wyników. Wyznaczenie podatności na ostateczną biodegradację umożliwia zastosowanie badanych substancji znakowanych za pomocą ^{14}C i określenie rozkładu fazy ^{14}C na końcu badania. Gdy użyta jest nieznakowana badana substancja, to ostateczną biodegradację można oszacować jedynie wówczas, jeśli badane jest wyższe stężenie i znane są wszystkie główne produkty przemiany.

1.2. DEFINICJE

Pierwotna biodegradacja: strukturalna zmiana (przemiana) substancji chemicznej przez mikroorganizmy, powodująca utratę chemicznej tożsamości.

Biodegradacja funkcjonalna: strukturalna zmiana (przemiana) substancji chemicznej przez mikroorganizmy, powodująca utratę określonej własności.

Ostateczna biodegradacja tlenowa: rozkład substancji chemicznej przez mikroorganizmy w obecności tlenu do dwutlenku węgla, wody i soli mineralnych wszelkich innych obecnych pierwiastków (mineralizacja) oraz wytworzenie nowej biomasy i produktów organicznych biosyntezy drobnoustrojowej.

Mineralizacja: rozkład substancji chemicznej lub materii organicznej przez mikroorganizmy w obecności tlenu do dwutlenku węgla, wody i soli mineralnych wszelkich innych obecnych pierwiastków.

Faza zastoju: czas od rozpoczęcia badania do osiągnięcia przystosowania się przez mikroorganizmy powodujące degradację oraz wzrostu stopnia biodegradacji substancji chemicznej lub materii organicznej do wykrywalnego poziomu (np. 10 % maksymalnej teoretycznej biodegradacji, bądź niższego, w zależności od dokładności techniki pomiarowej).

Maksymalny poziom biodegradacji: zapisany w procentach stopień biodegradacji substancji chemicznej lub materii organicznej podczas badania, powyżej którego nie następuje dalsza biodegradacja w trakcie badania.

Podstawowy substrat: zbiór naturalnych źródeł węgla i energii, które zapewniają wzrost i utrzymanie biomasy drobnoustrojowej.

Drugorzędny substrat: składnik substratowy obecny w tak niskim stężeniu, iż wskutek jego degradacji właściwym mikroorganizmom dostarczane są jedynie nieznaczne ilości węgla i energii w porównaniu do ilości węgla i energii dostarczanych w wyniku degradacji głównych składników substratowych (podstawowych substratów).

Stała szybkości degradacji: kinetyczna stała szybkości pierwszego rzędu lub pseudo pierwszego rzędu, k (d^{-1}), która wskazuje szybkość procesów biodegradacji. Dla doświadczenia prowadzonego okresowo k oszacowuje się na podstawie początkowej części krzywej biodegradacji uzyskanej po końcu fazy opóźniania.

▼M1

Czas półtrwania, $t_{1/2}$ (d): termin używany do charakteryzowania szybkości reakcji pierwszego rzędu. Jest to przedział czasu, który odpowiada zmniejszeniu się stężenia o czynnik 2. Czas półtrwania i stała szybkości biodegradacji związane są równaniem $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Półokres degradacji, DT_{50} (d): termin używany do ilościowego wyrażenia wyniku badań biodegradacji. Jest to przedział czasu, wraz z fazą opóźniania, potrzebny do osiągnięcia wartości biodegradacji wynoszącej 50 %.

Granica wykrywalności (LOD) i granica kwantyfikacji (LOQ): granica wykrywalności (LOD) jest to stężenie substancji, poniżej którego tożsamości substancji nie można odróżnić od ubocznych efektów analitycznych. Granica kwantyfikacji (LOQ) jest to stężenie substancji, poniżej którego stężenia nie można oznaczyć z zadowalającą dokładnością.

Rozpuszczony węgiel organiczny (RWO): ta część węgla organicznego w próbce wody, której nie można usunąć za pomocą określonej metody rozdzielania faz, na przykład poprzez odwirowanie przy 40 000 ms^{-2} przez 15 min lub przez filtrację przeponową z użyciem przepon o średnicy porów 0,2 μm–0,45 μm.

Aktywność całkowitego organicznego ^{14}C (TOA): całkowita aktywność ^{14}C związana z węglem organicznym.

Aktywność rozpuszczonego organicznego ^{14}C (DOA): całkowita aktywność ^{14}C związana z rozpuszczonym węglem organicznym.

Aktywność organicznego ^{14}C w postaci cząstek stałych (POA): całkowita aktywność ^{14}C związana z węglem organicznym w postaci cząstek stałych.

1.3. STOSOWALNOŚĆ BADANIA

Niniejsze badanie symulacyjne stosuje się do nielotnych lub nieznacznie lotnych substancji organicznych badanych w niskich stężeniach. Gdy używa się kolb otwartych do atmosfery (np. zamkniętych watą), to substancje o stałych prawa Henry'ego mniejszych niż około 1 Pa•m^3/mol (ok. 10^{-5} atm•m^3/mol) można w praktyce uważać za nielotne. Gdy używa się zamkniętych kolb z przestrzenią nad roztworem, to możliwe jest badanie nieznacznie lotnych substancji (o stałych prawa Henry'ego < 100 Pa•m^3/mol lub < 10^{-3} atm•m^3/mol) bez strat z układu próbnego. Strata substancji znakowanych przy pomocy ^{14}C może wystąpić, jeśli nie zachowuje się prawidłowych środków ostrożności podczas usuwania CO_2. W takich sytuacjach może być konieczne wychwycenie CO_2 w wewnętrznym absorberze z alkaliami lub użycie zewnętrznego układu absorbera CO_2 (bezpośrednie oznaczanie $^{14}CO_2$; zob. dodatek 3). Do wyznaczania kinetyki biodegradacji, stężenia badanej substancji muszą być niższe od jej rozpuszczalności w wodzie. Należy zwrócić uwagę jednak, że literaturowe wartości rozpuszczalności w wodzie mogą być znacznie wyższe niż rozpuszczalność badanej substancji w naturalnych wodach. Ewentualnie rozpuszczalność badanych substancji szczególnie trudno rozpuszczalnych w wodzie można ustalić przy użyciu naturalnych wód.

Metoda może być stosowana do symulowania biodegradacji w wodzie powierzchniowej wolnej od dużych cząstek („próba pelagiczna") lub w mętnej wodzie powierzchniowej, która może istnieć np. w pobliżu granicy faz woda/osad („próba z zawieszonym osadem").

▼M1

1.4. ZASADA BADANIA

Badanie przeprowadza się w systemie okresowym przez inkubowanie badanej substancji samą wodą powierzchniową („próba pelagiczna”) lub wodą powierzchniową doprawioną zawieszonymi cząstkami stałymi/osadem w ilości 0,01–1 g/l suchej masy („próba z zawieszonym osadem”), symulując zbiornik wodny z zawieszonymi cząstkami stałymi lub ponownie zawieszonym osadem. Stężenie zawieszonych cząstek stałych/osadu w dolnym zakresie tego przedziału jest typowe dla większości wód powierzchniowych. Kolby próbne inkubuje się w ciemności w temperaturze środowiska w warunkach aerobowych, stosując mieszanie. W celu określenia kinetyki degradacji należy użyć co najmniej dwóch różnych stężeń badanej substancji. Stężenia powinny różnić się od siebie o czynnik 5–10 i powinny reprezentować spodziewany zakres stężeń w środowisku. Maksymalne stężenie badanej substancji nie powinno przekraczać 100 µg/l, lecz aby zapewnić, że biodegradacja będzie przebiegać zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu preferowane jest stężenie wynoszące 10 µg/l lub mniej. Najniższe stężenie nie powinno przekraczać 10 µg/l, lecz preferowane są niższe stężenia próbne, wynoszące 1–2 µg/l lub poniżej 1 µg/l. Zwykle zadowalającą analizę tak niskich stężeń można wykonać, używając dostępnych w handlu substancji znakowanych za pomocą ^{14}C. Z uwagi na ograniczenia analityczne często niemożliwe jest zmierzenie stężenia badanej substancji z wymaganą dokładnością, jeżeli badana substancja jest zastosowana w stężeniu ≤ 100 µg/l (zob. akapit drugi w sekcji 1.7.2). Do identyfikacji i ilościowego oznaczenia głównych produktów przemiany lub wówczas, gdy nie jest dostępna konkretna metoda analityczna o niskiej granicy wykrywania, mogą być stosowane wyższe stężenia badanej substancji (> 100 µg/l, a niekiedy > 1 mg/l). Jeżeli badane są wysokie stężenia badanej substancji, to może być niemożliwe wykorzystanie wyników do oszacowania stałej i czasu półtrwania degradacji pierwszego rzędu, gdyż degradacja prawdopodobnie nie będzie przebiegać zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu.

Degradację śledzi się w odpowiednich odstępach czasu, mierząc resztkowy ^{14}C lub stężenie resztkowe badanej substancji, gdy stosowana jest specyficzna analiza chemiczna. Oznakowanie za pomocą ^{14}C najbardziej trwałej części cząsteczki zapewnia wyznaczenie całkowitej mineralizacji, podczas gdy oznakowanie przy pomocy ^{14}C mniej trwałej części cząsteczki, jak również zastosowanie specyficznej analizy, umożliwia ocenę jedynie biodegradacji pierwotnej. Jednakże najbardziej trwała część cząsteczki niekoniecznie obejmuje właściwą funkcjonalną część cząsteczki (którą można powiązać z określoną własnością, taką jak toksyczność, bioakumulacja, itp.). W tej sytuacji, aby śledzić eliminację określonej własności, stosowne może być wykorzystanie badanej substancji, która jest oznakowana za pomocą ^{14}C w części funkcjonalnej.

1.5. INFORMACJE O BADANEJ SUBSTANCJI

Do niniejszego badania mogą być używane substancje próbne zarówno znakowane, jak i nieznakowane izotopem promieniotwórczym. Zalecana jest technika znakowania za pomocą ^{14}C i znakowanie zwykle powinno być wykonane w najbardziej trwałej części(-ach) cząsteczki (zob. również — sekcja 1.4). W przypadku substancji zawierających więcej niż jeden pierścień aromatyczny, najlepiej jeden lub więcej atomów węgla w każdym pierścieniu powinno być oznakowanych za pomocą ^{14}C. Ponadto, najkorzystniej jest, jeśli za pomocą ^{14}C oznakowany jest jeden lub więcej atomów węgla po obydwu stronach wiązań łatwo ulegających degradacji. Chemiczna i/lub radiochemiczna czystość badanej substancji powinna wynosić > 95 %. Dla substancji znakowanych izotopem promieniotwórczym, preferowana jest aktywność właściwa wynosząca ok. 50 µCi/mg (1,85 MBq) lub więcej, aby ułatwić pomiary ^{14}C w badaniach prowadzonych przy niskich początkowych stężeniach. Powinny być dostępne następujące dane o badanej substancji:

▼M1

— rozpuszczalność w wodzie [metoda A.6],

— rozpuszczalność w organicznym rozpuszczalniku(-ach) (substancje stosowane z rozpuszczalnikiem lub substancje o niskiej rozpuszczalności w wodzie),

— stała dysocjacji (pKa), jeżeli substancja jest podatna na protonację lub deprotonację [OECD TG 112] (5),

— ciśnienie pary [metoda A.4] oraz stała prawa Henry'ego,

— chemiczna trwałość w wodzie i w ciemności (hydroliza) [metoda C.7].

Gdy słabo rozpuszczalne w wodzie substancje są badane w wodzie morskiej, to może być przydatna znajomość stałej wysalania (lub stałej „Setczenowa") K^s, którą określa wyrażenie: log (S/S') = K^s C_m, w którym S i S' jest rozpuszczalnością, odpowiednio, w wodzie słodkiej i w wodzie morskiej, a C_m stężeniem molowym soli.

Jeżeli badanie przeprowadza się jako „próbę zawieszonego osadu", to powinny być również dostępne następujące dane:

— współczynnik podziału n-oktanol/woda [metoda A.8],

— współczynnik adsorpcji [metoda C.18].

Do innych przydatnych danych mogą należeć:

— stężenie w środowisku, jeśli jest znane lub oszacowane,

— toksyczność badanej substancji w stosunku do mikroorganizmów [metoda C.11],

— gotowa i/lub naturalna podatność na biodegradację [metody C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)],

— podatność na aerobową lub anaerobową biodegradację w badaniach przemiany w glebie i osadzie/wodzie [metody C.23, C.24].

1.6. SUBSTANCJA ODNIESIENIA

Jako substancję odniesienia należy zastosować substancję, która normalnie łatwo ulega degradacji w warunkach aerobowych (tj. anilinę lub benzoesan sodu). Spodziewany okres dla degradacji aniliny i benzoesanu sodu wynosi zwykle mniej niż 2 tygodnie. Zadaniem substancji odniesienia jest zapewnienie, że aktywność drobnoustrojowa wody zawiera się w pewnych granicach, tzn. że woda zawiera aktywną populację drobnoustrojów.

▼M1

1.7. KRYTERIA JAKOŚCI

1.7.1. **Odzysk**

Natychmiast po dodaniu badanej substancji każde początkowe stężenie należy sprawdzić poprzez pomiary aktywności ^{14}C lub, w przypadku nieznakowanych substancji, za pomocą analiz chemicznych, w co najmniej podwójnych próbkach. Dostarcza to informacji o stosowalności i powtarzalności metody analitycznej oraz o jednorodności rozkładu badanej substancji. Zwykle w późniejszych analizach danych używa się zmierzonej początkowej aktywności ^{14}C lub stężenia badanej substancji zamiast nominalnego stężenia, gdyż w ten sposób kompensuje się straty spowodowane sorpcją i błędami dozowania. Dla substancji znakowanej za pomocą ^{14}C poziom odzysku na końcu doświadczenia dany jest przez bilans masy (zob. ostatni akapit w sekcji 1.8.9.4). Najlepiej jest, jeśli bilans masy znakowanej izotopem promieniotwórczym zawiera się w granicach 90–110 %, natomiast dla nieznakowanych badanych substancji dokładność analityczna powinna prowadzić do początkowego odzysku wynoszącego 70–110 %. Zakresy te należy interpretować jako docelowe i nie należy używać ich jako kryteriów dla przyjęcia badania. Ewentualnie dokładność analityczną można wyznaczyć dla badanej substancji w niższym stężeniu niż początkowe stężenie oraz dla głównych produktów przemiany.

1.7.2. **Powtarzalność i czułość metody analitycznej**

Powtarzalność metody analitycznej (w tym wydajność początkowej ekstrakcji) w ilościowym oznaczaniu badanej substancji oraz produktów przemiany, jeśli stosowne, należy sprawdzić za pomocą pięciu powtórzonych analiz indywidualnych ekstraktów wody powierzchniowej.

Granica wykrywalności (LOD) metody analitycznej dla badanej substancji i dla produktów przemiany powinna wynosić co najmniej 1 % początkowej ilości wprowadzonej do badanego układu, jeśli to możliwe. Granica kwantyfikacji (LOQ) powinna być mniejsza lub równa 10 % zastosowanego stężenia. Analizy chemiczne wielu substancji organicznych i produktów ich przemiany często wymagają, aby badana substancja była wprowadzona w stosunkowo dużym stężeniu, tj. > 100 μg/l.

1.8. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.8.1. **Sprzęt**

Badanie można prowadzić w kolbach stożkowych lub cylindrycznych o odpowiedniej pojemności (np. 0,5 lub 1,0 litra) zamkniętych korkiem silikonowym lub gumowym bądź w kolbach na surowicę z wieczkami szczelnymi dla CO_2 (np. przykrywkami z gumy butylowej). Inną możliwością jest prowadzenie badania przy użyciu wielu kolb i zbieranie całych kolb, co najmniej podwójnie, o każdym czasie przewidzianym na pobranie próbki (zob. ostatni akapit w sekcji 1.8.9.1). Dla nielotnych badanych substancji, które nie są oznakowane izotopem promieniotwórczym, nie są wymagane gazoszczelne korki lub przykrywki; odpowiednie są luźne tampony z waty, które zapobiegają zanieczyszczeniu z powietrza (zob. akapit drugi w sekcji 1.8.9.1). Nieznacznie lotne substancje należy badać w układzie typu biometr z łagodnym mieszaniem powierzchni wody. Aby być pewnym, że nie występuje zanieczyszczenie bakteryjne, przed użyciem naczynia można dodatkowo wysterylizować przez ogrzanie lub autoklawizowanie. Ponadto używany jest następujący standardowy sprzęt laboratoryjny:

— stół wibracyjny lub mieszadła magnetyczne do ciągłego mieszania kolb próbnych,

▼M1

— wirówka,

— pehametr,

— turbidymetr do nefelometrycznych pomiarów zmętnienia,

— piec lub kuchenka mikrofalowa do oznaczeń masy suchej,

— aparat do filtracji przeponowej,

— autoklaw lub piec do sterylizacji szkła laboratoryjnego,

— urządzenia do manipulacji substancjami oznakowanymi przy pomocy ^{14}C,

— sprzęt do ilościowego określania aktywności ^{14}C w próbkach pobranych z roztworów wychwytujących CO_2 oraz, jeśli to wymagane, w próbkach osadu,

— sprzęt analityczny do oznaczania badanej substancji (i substancji odniesienia), jeżeli stosowana jest specyficzna analiza chemiczna (np. chromatograf gazowy, wysokociśnieniowy chromatograf cieczowy).

1.8.2. **Roztwory wzorcowe badanej substancji**

Do sporządzenia roztworów podstawowych badanej substancji i substancji odniesienia używa się wody dejonizowanej (zob. akapit pierwszy w sekcji 1.8.7). Woda dejonizowana powinna być wolna od substancji, które mogą być toksyczne dla mikroorganizmów, zaś stężenie rozpuszczonego węgla organicznego (RWO) nie powinno być większe niż 1 mg/l (6).

1.8.3. **Pobranie i transport wody powierzchniowej**

Miejsce do pobrania próbki wody powierzchniowej należy wybrać stosownie do celu badania w danej sytuacji. Przy wyborze miejsc do pobrania próbki należy wziąć pod uwagę historię możliwych wprowadzanych zanieczyszczeń rolniczych, przemysłowych lub domowych. Jeżeli wiadomo, że środowisko wodne było zanieczyszczane badaną substancją lub jej strukturalnymi analogami w ciągu poprzednich czterech lat, to nie należy go wykorzystywać do pobrania wody do badania, chyba że wyraźnym celem badacza jest zbadanie szybkości degradacji w poprzednio eksponowanych miejscach. W miejscu pobrania należy zmierzyć pH i temperaturę wody. Ponadto należy odnotować głębokość pobierania próbki oraz wygląd próbki wody (np. barwę i mętność) (zob. sekcja 3). Należy zmierzyć stężenie tlenu i/lub potencjał redoks w wodzie i w powierzchniowej warstwie osadu, aby wykazać istnienie warunków aerobowe, chyba że jest to oczywiste na podstawie oceny wyglądu i historycznych doświadczeń dotyczących miejsca. Wodę powierzchniową należy transportować w dokładnie wyczyszczonym pojemniku. Podczas transportu, temperatura próbki nie powinna znacząco przekraczać temperatury stosowanej w badaniu. Zalecane jest ochłodzenie do temperatury 4 °C, jeśli czas trwania transportu przekracza 2–3 godziny. Próbki wody nie wolno zamrażać.

▼M1

1.8.4. **Przechowywanie i przygotowywanie wody powierzchniowej**

Badanie najlepiej jest rozpocząć w ciągu jednego dnia od pobrania próbki. Przechowywanie wody, jeśli konieczne, powinno być ograniczone do minimum i w żadnym wypadku nie może przekroczyć maksymalnego okresu wynoszącego 4 tygodnie. Do czasu użycia próbkę wody należy utrzymywać w temperaturze 4 °C z napowietrzaniem. Przed użyciem należy usunąć duże cząstki, np. za pomocą filtracji przez filtr nylonowy o rozmiarze otworów 100 μm lub przez zgrubny filtr papierowy bądź poprzez sedymentację.

1.8.5. **Sporządzenie wody doprawionej osadem (do wyboru)**

Do próby zawieszonego osadu do kolb zawierających naturalną wodę (przefiltrowaną w celu usunięcia dużych cząstek, jak opisano w sekcji 1.8.4) dodaje się osad powierzchniowy, aby uzyskać zawiesinę; stężenie zawieszonych cząstek stałych powinno zawierać się w granicach 0,01–1 g/l. Osad powierzchniowy powinien pochodzić z tego samego miejsca, z którego pobrano próbkę wody. W zależności od konkretnego środowiska wodnego osad powierzchniowy może charakteryzować się wysoką zawartością węgla organicznego (2,5–7,5 %) i drobnoziarnistą strukturą lub niską zawartością węgla organicznego (0,5–2,5 %) i gruboziarnistą strukturą (3). Osad powierzchniowy można przygotować następująco: pobrać kilka rdzeni osadu, używając rurki z przezroczystego tworzywa sztucznego, natychmiast po pobraniu próbek odciąć górne warstwy aerobowe (od powierzchni do głębokości maks. 5 mm) i połączyć je z sobą. Otrzymaną w wyniku próbkę osadu należy przetransportować w pojemniku z dużą objętością powietrza nad osadem, aby utrzymać osad w warunkach aerobowych (ochłodzić do temperatury 4 °C, jeśli czas transportu przekracza 2–3 godziny). Z próbki osadu należy sporządzić zawiesinę w badanej wodzie w stosunku 1:10 i do czasu użycia utrzymywać w temperaturze 4 °C z napowietrzaniem. Przechowywanie osadu, jeśli jest wymagane, powinno być ograniczone do minimum i w żadnym wypadku nie może przekroczyć maksymalnego okresu wynoszącego 4 tygodnie.

1.8.6. **Procedura półciągła (do wyboru)**

Jeśli występuje długa zwłoka czasowa, to może być wymagana dłuższa inkubacja (trwająca kilka miesięcy), zanim można będzie zmierzyć znaczącą degradację badanej substancji. Jeśli wiadomo o tym z poprzedniego badania substancji, to badanie można rozpocząć, stosując procedurę półciągłą, która pozwala na okresową wymianę części badanej wody lub zawiesiny (zob. dodatek 2). Alternatywnie normalne badanie prowadzone w systemie okresowym można zamienić na badanie półciągłe, jeśli nie została osiągnięta degradacja badanej substancji w ciągu około 60 dni badania z użyciem procedury okresowej (zob. akapit drugi w sekcji 1.8.8.3).

1.8.7. **Dodanie substancji badanej (lub odniesienia)**

W przypadku substancji o wysokiej rozpuszczalności w wodzie (> 1 mg/L) i małej lotności (stałe prawa Henry'ego < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ lub < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) roztwór podstawowy można sporządzić w wodzie dejonizowanej (zob. sekcja 1.8.2); odpowiednią objętość roztworu podstawowego dodaje się do naczyń próbnych, aby uzyskać żądane stężenie. Objętość każdego dodawanego roztworu podstawowego należy ograniczyć do praktycznie możliwego minimum (< 10 % końcowej objętości cieczy, jeśli to możliwe). Inna procedura polega na rozpuszczeniu badanej substancji w dużej objętości badanej wody, co można uważać za procedurę alternatywną dla użycia rozpuszczalników organicznych.

▼M1

Jeśli to nieuniknione, roztwory podstawowe nielotnych substancji o słabej rozpuszczalności w wodzie należy sporządzić przy użyciu lotnego rozpuszczalnika organicznego, lecz ilość rozpuszczalnika dodanego do układu nie powinna przekraczać 1 % obj. i nie powinna mieć negatywnych wpływów na aktywność drobnoustrojów. Rozpuszczalnik nie powinien wpływać na stabilność badanej substancji w wodzie. Rozpuszczalnik należy ograniczyć do bardzo małej ilości, tak aby nie zwiększył znacząco stężenia RWO w badanej wodzie lub zawiesinie. Należy to sprawdzić za pomocą analizy specyficznej dla substancji lub, jeśli to możliwe, za pomocą analizy RWO (6). Należy starać się ograniczyć ilość przenoszonego rozpuszczalnika do absolutnie niezbędnej wielkości oraz upewnić się, że ilość badanej substancji może rozpuścić się w końcowej objętości badanej wody. Do wprowadzenia badanej substancji do naczyń próbnych można użyć innych technik, takich jak opisane w (7) i (8). Gdy do wprowadzenia badanej substancji użyty jest rozpuszczalnik organiczny, to próby z rozpuszczalnikiem zawierające badaną wodę (bez dodatków) i badaną wodę z dodatkiem substancji odniesienia należy potraktować podobnie, jak aktywne naczynia próbne zaprawione badaną substancją w nośniku rozpuszczalnikowym. Celem użycia prób kontrolnych z rozpuszczalnikiem jest zbadanie możliwych ujemnych skutków powodowanych przez rozpuszczalnik w populacji mikroorganizmów, uwidocznionych przez degradację substancji odniesienia.

1.8.8. **Warunki badania**

1.8.8.1. *Temperatura badania*

Inkubacja powinna odbywać się w ciemności (preferowane) lub w rozproszonym świetle w regulowanej temperaturze (± 2 °C), którą może być temperatura polowa lub standardowa temperatura 20–25 °C. Temperaturą polową może być rzeczywista temperatura próbki w czasie jej pobierania lub średnia temperatura otoczenia w miejscu pobierania próbki.

1.8.8.2. *Mieszanie*

Należy zapewnić mieszanie poprzez ciągłe wstrząsanie lub mieszanie, aby utrzymać cząstki i mikroorganizmy w zawiesinie. Mieszanie ułatwia również przenoszenie tlenu z przestrzeni nad cieczą do cieczy, tak aby mogły być należycie utrzymane warunki aerobowe. Ustawić kolby na stole wibracyjnym (z prędkością mieszania ok. 100 obr./min) lub użyć mieszadła magnetycznego. Mieszanie musi być ciągłe. Jednakże wstrząsanie lub mieszanie powinno być możliwie jak najbardziej łagodne, przy jednoczesnym utrzymywaniu jednorodnej zawiesiny.

1.8.8.3. *Czas trwania badania*

Czas trwania badania zwykle nie powinien przekraczać 60 dni, chyba że zastosowana jest procedura półciągła z okresową wymianą badanej zawiesiny (zob. sekcja 1.8.6 i dodatek 2). Jednakże okres badania w przypadku próby okresowej może być przedłużony do 90 dni, jeżeli degradacja badanej substancji rozpoczęła się w ciągu pierwszych 60 dni. Degradację monitoruje się w odpowiednich odstępach czasu poprzez wyznaczanie aktywności resztkowego ^{14}C lub wydzielonego $^{14}CO_2$ (zob. sekcja 1.8.9.4) i/lub za pomocą analizy chemicznej (sekcja 1.8.9.5). Czas inkubacji musi być wystarczająco długi, aby ocenić proces degradacji. Stopień degradacji najlepiej powinien przekraczać 50 %; w przypadku substancji powoli ulegających degradacji, stopień degradacji musi być dostateczny (zwykle większy niż 20 % degradacji), aby zapewnić oszacowanie kinetycznej stałej szybkości degradacji.

▼M1

Należy prowadzić okresowe pomiary pH i stężenia tlenu w układzie, chyba że poprzednie doświadczenia uzyskane z podobnych badań z udziałem próbek wody i osadu pobranych z tego samego miejsca wskazują, że pomiary takie są niepotrzebne. W pewnych warunkach może zdarzyć się, że metabolizm podstawowych substratów przy znacznie wyższych stężeniach w wodzie lub osadzie spowoduje na tyle duże wydzielenie się CO_2 i wyczerpanie się tlenu, że znacząco zmieni warunki doświadczalne podczas badania.

1.8.9. **Procedura**

1.8.9.1. *Przygotowanie kolb do próby pelagicznej*

Przenieść odpowiednią objętość badanej wody do kolb próbnych do około jednej trzeciej objętości kolby, ale nie mniej niż około 100 ml. Jeżeli użytych jest wiele kolb (w celu umożliwienia zebrania całych kolb o każdym czasie pobierania próbek), to odpowiednia objętość badanej wody również wynosi około 100 ml, gdyż małe objętości próbek mogą wpływać na długość fazy zastoju. Badaną substancję dodaje się z roztworu podstawowego, jak opisano w sekcjach 1.8.2 i 1.8.7. Należy użyć co najmniej dwóch różnych stężeń badanej substancji, różniących się o czynnik 5–10, aby określić kinetykę degradacji i obliczyć kinetyczną stałą szybkości degradacji. Obydwa wybrane stężenia powinny być mniejsze niż 100 μg/l, a najlepiej powinny zawierać się w przedziale < 1–10 μg/l.

Zamknąć kolby korkami lub przykrywkami nieprzepuszczalnymi dla powietrza i CO_2. Dla nieznakowanych za pomocą ^{14}C nielotnych badanych substancji chemicznych odpowiednie są luźne tampony z waty, które zapobiegają przedostawaniu się zanieczyszczeń z powietrza (zob. sekcja 1.8.1), pod warunkiem iż wiadomo, że wszelkie główne produkty degradacji są nielotne i jeżeli stosowane jest bezpośrednie oznaczanie CO_2 (zob. dodatek 3).

Inkubować kolby w wybranej temperaturze (zob. sekcja 1.8.8.1). Pobrać próbki do analizy chemicznej lub pomiarów ^{14}C na początku badania (tj. przed rozpoczęciem się biodegradacji; zob. sekcja 1.7.1), a następnie w odpowiednich odstępach czasu w trakcie przebiegu badania. Próbkowanie można przeprowadzić przez pobranie podpróbek (np. porcji po 5 ml) z każdego replikatu lub przez zebranie całych kolb o każdym czasie próbkowania. Mineralizację badanej substancji można określić pośrednio lub bezpośrednio (zob. dodatek 3). Zwykle podczas fazy degradacji (tj. po zakończeniu fazy zastoju) wymaganych jest minimum pięć punktów próbkowania w celu oszacowania wiarygodnej stałej szybkości, chyba że można uzasadnić, iż dla substancji szybko ulegających degradacji wystarczą trzy punkty próbkowania. W przypadku substancji, które nie ulegają szybko degradacji, można z łatwością wykonać większą ilość pomiarów podczas fazy degradacji i dlatego do oszacowania k należy użyć więcej punktów danych. Nie można podać ustalonego harmonogramu pobierania próbek, gdyż szybkość biodegradacji jest zmienna; jednakże zaleca się, aby pobrać próbkę raz na tydzień, jeśli degradacja jest powolna. Jeżeli badana substancja szybko ulega degradacji, to pobranie próbki powinno odbywać się raz na dzień w ciągu pierwszych trzech dni, a następnie co dwa lub trzy dni. W niektórych sytuacjach, jak na przykład w przypadku substancji szybko hydrolizujących, może być konieczne pobieranie próbek w odstępach godzinnych. Zaleca się, aby przed badaniem przeprowadzić badanie wstępne w celu określenia odpowiednich odstępów próbkowania. Jeżeli próbki muszą być dostępne do dalszej specjalnej analizy, to wskazane jest, aby pobrać większą ilość próbek, a następnie wybrać te, które będą analizowane na końcu doświadczenia, postępując według strategii „wstecz”, zgodnie z którą ostatnie próbki są analizowane jako pierwsze (zob. akapit drugi w sekcji 1.8.9.5, gdzie podano wskazówki dotyczące trwałości próbek w czasie przechowywania).

▼M1

1.8.9.2. *Liczba kolb i próbek*

Przygotować dostateczną ilość kolb próbnych, tak aby mieć:

— kolby próbne; co najmniej po dwie kolby do każdego stężenia badanej substancji (najlepiej minimum 3) lub wiele kolb próbnych do każdego stężenia, jeżeli o każdym czasie próbkowania zbierane są całe kolby (symbol F_T),

— kolby próbne do obliczenia bilansu masy; co najmniej pod dwie kolby do każdego badanego stężenia (symbol F_M),

— ślepą próbę kontrolną, bez badanej substancji; co najmniej jedną kolbę próbną zawierającą tylko badaną wodę (symbol F_B),

— porównawczą próbę kontrolną; po dwie kolby z substancją odniesienia (np. aniliną lub benzoesanem sodu, o stężeniu 10 µg/l) (symbol F_C). Celem porównawczej próby kontrolnej jest potwierdzenie minimalnej aktywności drobnoustrojów. Jeśli jest to dogodne, można użyć substancji odniesienia znakowanej izotopem promieniotwórczym, także wówczas, gdy degradacja badanej substancji jest monitorowana za pomocą analiz chemicznych,

— sterylną próbę kontrolną; jedną lub dwie kolby zawierające wysterylizowaną badaną wodę do zbadania możliwej abiotycznej degradacji lub innego niebiologicznego usuwania badanej substancji (symbol F_S). Biologiczną aktywność można zatrzymać przez autoklawizowanie badanej wody (121 °C; 20 min) lub przez dodanie środka toksycznego (np. azydku sodowego (NaN_3) o stężeniu 10–20 g/l, chlorku rtęciowego ($HgCl_2$) o stężeniu 100 mg/l lub formaliny o stężeniu 100 mg/l) bądź przez napromieniowanie promieniami gamma. Jeżeli wykorzystuje się $HgCl_2$, to należy go zutylizować, tak jak odpad toksyczny. W przypadku wody z osadem dodanym w dużej ilości nie jest łatwo uzyskać sterylne warunki; w takim przypadku zaleca się kilkukrotne (np. trzykrotne) autoklawizowanie. Należy wziąć pod uwagę, że wskutek autoklawizowania może zmienić się charakterystyka sorpcyjna osadu,

— próby kontrolne z rozpuszczalnikiem, zawierające badaną wodę oraz badaną wodę z substancją odniesienia; po dwie kolby potraktowane taką samą ilością rozpuszczalnika i przy zastosowaniu takiej samej procedury, jak użyta do wprowadzania badanej substancji. Celem jest zbadanie możliwych negatywnych wpływów rozpuszczalnika przez określenie degradacji badanej substancji.

W planie badania badacz powinien wziąć pod uwagę względne znaczenie zwiększonej ilości powtórzeń doświadczalnych w zależności od zwiększonej krotności próbkowania. Dokładna liczba potrzebnych kolb zależeć będzie od metody użytej do mierzenia degradacji (zob. akapit trzeci w sekcji 1.8.9.1; sekcja 1.8.9.4 i dodatek 3).

▼M1

O każdym czasie próbkowania, z każdej kolby próbnej należy pobrać dwie podpróbki (np. porcje po 5 ml). Jeżeli używa się wielu kolb dla umożliwienia zbierania całych kolb, to każdorazowo podczas próbkowania należy poświęcić minimum dwie kolby (zob. akapit pierwszy w sekcji 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Przygotowanie kolb do próby z zawieszonym osadem [do wyboru]*

Dodać do naczyń próbnych niezbędne objętości badanej wody i osadu, jeśli jest wymagany (zob. sekcja 1.8.5). Przygotowanie kolb do próby z zawieszonym osadem jest takie samo, jak dla próby pelagicznej (zob. sekcje 1.8.9.1 i 1.8.9.2). Najlepiej jest użyć butelek na osocze lub kolb o podobnym kształcie. Umieścić zamknięte kolby poziomo na wstrząsarce. Oczywiście otwarte kolby w przypadku nielotnych substancji nieznakowanych za pomocą ^{14}C należy ustawić w pozycji pionowej; w tym przypadku zaleca się mieszanie magnetyczne i użycie mieszadełek magnetycznych pokrytych szkłem. Jeśli to konieczne, napowietrzać butelki, aby utrzymać odpowiednie warunki aerobowe.

1.8.9.4. *Oznaczenia radiochemiczne*

Wydzielający się $^{14}CO_2$ mierzy się pośrednio i bezpośrednio (zob. dodatek 3). $^{14}CO_2$ oznacza się pośrednio na podstawie różnicy pomiędzy początkową aktywnością ^{14}C w badanej wodzie lub zawiesinie a całkowitą aktywnością resztkową podczas pobierania próbek, zmierzoną po zakwaszeniu próbki do pH 2–3 i usunięciu CO_2. Węgiel nieorganiczny zostaje w ten sposób usunięty, a zmierzona aktywność resztkowa pochodzi od materiału organicznego. Pośredniego oznaczania $^{14}CO_2$ nie należy stosować, jeżeli podczas przemiany badanej substancji tworzą się główne produkty przemiany, które są lotne (zob. dodatek 3). Jeśli to możliwe, wydzielenie $^{14}CO_2$ należy zmierzyć bezpośrednio (zob. dodatek 3) podczas pobierania próbek w co najmniej jednej kolbie próbnej; procedura ta umożliwia sprawdzenie zarówno bilansu masy, jak i procesu biodegradacji, lecz ogranicza się do prób prowadzonych z zamkniętymi kolbami.

Jeżeli wydzielony $^{14}CO_2$ mierzy się bezpośrednio podczas badania, to w tym celu na początku badania należy przygotować większą ilość kolb. Bezpośrednie oznaczanie $^{14}CO_2$ jest zalecane, jeżeli podczas przemiany badanej substancji tworzą się lotne główne produkty przemiany. W każdym momencie pomiaru dodatkowe kolby próbne zakwasza się do pH 2–3, a $^{14}CO_2$ zbiera się w wewnętrznym lub zewnętrznym absorberze (zob. dodatek 3).

Ewentualnie, badaną substancję znakowaną za pomocą ^{14}C oraz główne produkty przemiany można oznaczać przy zastosowaniu radiochromatografii (np. chromatografii cienkowarstwowej, RAD-TLC) lub HPLC z detekcją radiochemiczną.

Ewentualnie można wyznaczyć rozkład fazowy pozostającej radioaktywności (zob. dodatek 1) oraz resztkowej badanej substancji i produktów przemiany.

▼M1

Na końcu badania należy wyznaczyć bilans masy przez bezpośredni pomiar $^{14}CO_2$, używając oddzielnych kolb próbnych, z których próbki nie są pobierane w trakcie badania (zob. dodatek 3).

1.8.9.5. *Specyficzna analiza chemiczna*

Jeśli dysponuje się czułą specyficzną metodą analityczną, to pierwotną biodegradację można ocenić, mierząc całkowite resztkowe stężenie badanej substancji, zamiast używania technik znakowania izotopem promieniotwórczym. Jeżeli użyta jest substancja znakowana izotopem promieniotwórczym (w celu zmierzenia całkowitej mineralizacji), to równolegle można wykonać specyficzną analizę chemiczną, aby uzyskać przydatne dodatkowe informacje i sprawdzić procedurę. Specyficznych analiz chemicznych można również użyć do zmierzenia produktów przemiany powstałych podczas degradacji badanej substancji i jest to zalecane dla substancji, które są mineralizowane z czasem półtrwania przekraczającym 60 dni. Za każdym razem podczas próbkowania należy zmierzyć stężenie badanej substancji i produktów przemiany i podać je w sprawozdaniu (jako stężenie i jako procentowość zastosowanego stężenia). Na ogół powinno się identyfikować produkty przemiany wykryte w ilości ≥ 10 % zastosowanego stężenia podczas każdego próbkowania, o ile nie jest uzasadnione inaczej istotnymi względami. Produkty przemiany, dla których stężenia wzrastają w sposób ciągły podczas badania, należy również uwzględnić przy identyfikacji, nawet jeśli ich stężenia nie przekraczają podanej wyżej granicy, gdyż może to oznaczać utrzymywanie się tendencji. Analizy produktów przemiany w próbach sterylizowanych powinny być wzięte pod uwagę, jeżeli uważa się za możliwą szybką abiotyczną przemianę badanej substancji (np. hydrolizę). Potrzebę kwantyfikacji i identyfikacji produktów przemiany należy rozważyć dla każdego przypadku oddzielnie, z podaniem uzasadnień w sprawozdaniu. Techniki ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika organicznego należy zastosować zgodnie ze wskazówkami podanymi w odnośnej procedurze analitycznej.

Wszystkie próbki należy przechowywać w temperaturze 2–4 °C i w warunkach hermetycznych, jeśli analizę przeprowadza się w ciągu 24 godzin (preferowane). Do dłuższego przechowywania, próbki należy zamrozić do temperatury poniżej – 18 °C lub chemicznie zakonserwować. Zakwaszanie nie jest zalecanym sposobem konserwacji próbek, ponieważ zakwaszone próbki mogą być nietrwałe. Jeżeli próbki nie są zanalizowane w ciągu 24 i są poddane dłuższemu przechowywaniu, to należy przeprowadzić badanie trwałości podczas przechowywania w celu wykazania trwałości substancji chemicznych będących przedmiotem zainteresowania w temperaturze poniżej – 18 °C lub w warunkach konserwacji. Jeżeli metoda analityczna wiąże się z ekstrakcją rozpuszczalnikową lub ekstrakcją fazy stałej (SPE), to ekstrakcję należy wykonać natychmiast po pobraniu próbki lub po przechowaniu schłodzonej próbki maksymalnie przez 24 godziny.

W zależności od czułości metody analitycznej, mogą być konieczne większe objętości próbek niż te, które podano w sekcji 1.8.1. Badanie można łatwo przeprowadzić z objętościami próbnymi wynoszącymi jeden litr w kolbach o pojemności 2–3 litrów, co pozwala na pobranie próbek o objętości ok. 100 ml.

▼M1

2. **DANE ORAZ SPORZĄDZENIE SPRAWOZDANIA**

2.1. OBRÓBKA WYNIKÓW

2.1.1. **Wykreślne przedstawienie danych**

Zaokrąglić czasy pobierania próbek do całkowitej liczby godzin (chyba że substancja ulega istotnej degradacji w czasie trwającym w minutach lub godzinach), lecz nie do całkowitej liczby dni. Wykreślić oszacowane wartości aktywności resztkowej badanej substancji (dla substancji znakowanych za pomocą ^{14}C) lub stężenie resztkowe (dla nieznakowanych substancji) w zależności od czasu na wykresie liniowym lub półlogarytmicznym (zob. rysunki 1a, 1b). Jeśli miała miejsce degradacja, to porównać wyniki z kolb F_T z wynikami z kolb F_S. Jeżeli średnie wyników uzyskanych z kolb z badaną substancją (F_T) i kolb sterylizowanych (F_S) różnią się o mniej niż 10 %, to można założyć, że zaobserwowana degradacja jest w przeważającej mierze abiotyczna. Jeżeli degradacja w kolbach F_S jest mniejsza, to wielkości tych można użyć do skorygowania wielkości uzyskanych z kolb F_T (przez odjęcie), aby oszacować stopień biodegradacji. Gdy wykonywane są dodatkowe analizy dla głównych produktów przemiany, to należy również przedstawić wykres ich powstawania i spadku zawartości, oprócz wykresu spadku zawartości badanej substancji.

Oszacować czas trwania fazy zastoju t_L na podstawie krzywej degradacji (wykresu półlogarytmicznego) przez ekstrapolację jej liniowej części do zerowej degradacji lub, alternatywnie, przez wyznaczenie czasu dla przybliżonej 10 % degradacji (zob. rysunki 1a i 1b). Na podstawie wykresu półlogarytmicznego oszacować stałą szybkości pierwszego rzędu, k, oraz jej błąd standardowy za pomocą regresji liniowej ln (aktywności resztkowej ^{14}C lub stężenia badanej substancji) w zależności od czasu. W szczególności w przypadku pomiarów ^{14}C użyć tylko danych należących do początkowej liniowej części krzywej po zakończonej fazie zastoju i wybrać raczej niewielką liczbę reprezentatywnych danych niż większą liczbę bardziej niepewnych danych. Niepewność obejmuje tu błędy związane z zaleconym bezpośrednim użyciem zmierzonych aktywności resztkowego ^{14}C (zob. poniżej). Niekiedy może być właściwe obliczenie dwu różnych stałych szybkości, jeżeli degradacja przebiega dwufazowo. W tym celu określono dwie różne fazy krzywej degradacji. Obliczenia stałej szybkości, k, oraz czasu półtrwania $t_{½} = \ln 2/k$ należy przeprowadzić dla każdej spośród indywidualnych replikatowych kolb, gdy podpróbki są pobrane z tej samej kolby, lub używając średnich wartości, gdy podczas każdego próbkowania zbierane są pełne kolby (zob. ostatni akapit w sekcji 1.8.9.2). Gdy użyta jest pierwsza z wymienionych procedur, to stałą szybkości i czas półtrwania należy podać w sprawozdaniu dla każdej z indywidualnych replikatowych kolb oraz jako wartość średnią z błędem standardowym. Jeśli użyto wysokich stężeń badanej substancji, to krzywa degradacji może znacznie odbiegać od linii prostej (wykresu półlogarytmicznego) i kinetyka pierwszego rzędu może nie być ważna. Określenie półokresu nie posiada więc znaczenia. Jednakże dla ograniczonego zakresu danych można zastosować kinetykę pseudo pierwszego rzędu i oszacować półokres degradacji DT_{50} (czas do osiągnięcia 50 % degradacji). Należy pamiętać jednak, że przebiegu czasowego degradacji poza wybranym zakresem danych nie da się przewidzieć przy użyciu DT_{50}, który jest jedynie deskryptorem danego zbioru danych. Analityczne narzędzia służące do ułatwienia obliczeń statystycznych i dopasowywania krzywych są łatwo dostępne i zaleca się użycie tego rodzaju oprogramowania.

▼M1

Jeżeli wykonywane są specyficzne analizy chemiczne, należy oszacować stałe szybkości i czas półtrwania dla pierwotnej degradacji, jak powyżej dla całkowitej mineralizacji. Jeżeli pierwotna degradacja jest procesem ograniczającym, to można niekiedy użyć punktów danych z całego przebiegu degradacji. Wynika to stąd, iż pomiary te są bezpośrednie, w przeciwieństwie do pomiarów aktywności ^{14}C.

Jeżeli są używane substancje znakowane za pomocą ^{14}C, to bilans masy należy wyrazić w procentach zastosowanego stężenia, przynajmniej na końcu badania.

2.1.2. **Aktywność resztkowa**

Gdy znakowana za pomocą ^{14}C część substancji organicznej ulega biodegradacji, to znaczna część ^{14}C zamienia się w $^{14}CO_2$, podczas gdy reszta zostaje zużyta do wzrostu biomasy i/lub syntezy pozakomórkowych metabolitów. Dlatego pełna „ostateczna" biodegradacja substancji nie powoduje 100 % zamiany jej węgla w $^{14}CO_2$. ^{14}C wbudowany w produkty utworzone w wyniku biosyntezy jest następnie powoli uwalniany jako $^{14}CO_2$ na skutek „wtórnej mineralizacji". Z tych powodów wykresy zależności aktywności resztkowego organicznego ^{14}C (zmierzonej po usunięciu CO_2) lub wytworzonego $^{14}CO_2$ od czasu wykazywać będą tworzenie się „ogona" po zakończeniu degradacji. Komplikuje to kinetyczną interpretację danych i w tym celu do oszacowania stałej szybkości degradacji zwykle należy wykorzystać tylko początkową część krzywej (po zakończeniu się fazy zastoju a przed osiągnięciem ok. 50 % degradacji). Jeżeli badana substancja ulega degradacji, to całkowita aktywność resztkowego organicznego ^{14}C jest zawsze wyższa od aktywności ^{14}C związanego z pozostałą nienaruszoną badaną substancją. Jeżeli badana substancja ulega degradacji wskutek reakcji pierwszego rzędu i stały ułamek α zostaje zmineralizowany do CO_2, to początkowe nachylenie krzywej zaniku ^{14}C (całkowity organiczny ^{14}C w zależności od czasu) będzie równe α razy nachylenie odpowiedniej krzywej dla stężenia badanej substancji (lub, ściślej biorąc, części badanej substancji oznakowanej za pomocą ^{14}C). Gdy używa się pomiarów aktywności całkowitego organicznego ^{14}C bez korekty, to obliczona stała szybkości degradacji będzie stanowić ostrożne oszacowanie. Procedury szacowania stężeń badanych substancji na podstawie aktywności radiochemicznych, oparte o różne upraszczające założenia, zostały opisane w literaturze (2)(9)(10)(11). Procedury takie najłatwiej jest stosować do substancji szybko ulegających degradacji.

2.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Jeżeli stwierdza się, że k jest niezależna od dodanego stężenia (tj. jeżeli obliczona k jest w przybliżeniu taka sama przy różnych stężeniach badanej substancji), to można założyć, że stała szybkości pierwszego rzędu jest reprezentatywna dla zastosowanych warunków badania, tj. badanej substancji, próbki wody i temperatury badania. To, w jakim stopniu wyniki można uogólnić lub ekstrapolować do innych układów, musi zostać określone na podstawie specjalistycznej opinii. Jeżeli użyte jest wysokie stężenie badanej substancji i w związku z tym degradacja nie przebiega zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu, to danych nie można wykorzystać do bezpośredniego oszacowania stałej szybkości pierwszego rzędu lub odpowiadającego jej czasu półtrwania. Jednakże dane pochodzące z badania, w którym użyto wysokiego stężenia badanej substancji, mogą nadal być przydatne do oszacowania stopnia całkowitej mineralizacji i/lub wykrycia i kwantyfikacji produktów przemiany.

▼M1

Jeżeli znane są szybkości procesów powodujących stratę, innych niż biodegradacja (np. hydrolizy lub ulatniania się), to można odjąć je od szybkości straty netto zaobserwowanej podczas badania, uzyskując przybliżone oszacowanie szybkości biodegradacji. Dane dla hydrolizy, na przykład, można uzyskać ze sterylnej próby kontrolnej lub z równoległego badania z użyciem wyższego stężenia badanej substancji.

Pośrednie i bezpośrednie oznaczanie $^{14}CO_2$ (sekcja 1.8.9.4 i dodatek 3) można zastosować jedynie do pomiaru stopnia mineralizacji badanej substancji do CO_2. Do analizy stężeń badanej substancji znakowanej za pomocą ^{14}C oraz powstawania głównych produktów przemiany można zastosować radiochromatografię (RAD-TLC) lub HPLC (akapit trzeci w sekcji 1.8.9.4). Aby umożliwić bezpośrednie oszacowanie czasu półtrwania główne produkty przemiany (określone jako ≥ 10 % zastosowanej ilości badanej substancji) muszą być nieobecne. Jeżeli występują główne produkty przemiany, zgodnie z powyższym określeniem, wymagana jest szczegółowa ocena danych. Może ona obejmować wielokrotne badania i/lub identyfikację produktów przemiany (zob. akapit pierwszy w sekcji 1.8.9.5), chyba że los produktów przemiany można w sposób rozsądny ocenić na podstawie doświadczenia (np. informacji o drodze degradacji). Ponieważ część badanej substancji ulegająca przemianie w CO_2 jest zmienna (zależąc w dużej mierze od stężenia badanej substancji oraz innych dostępnych substratów, warunków badania oraz zespołu drobnoustrojów), badanie to nie pozwala na proste oszacowanie ostatecznej biodegradacji, jak w próbie zanikania RWO; lecz wynik jest podobny do uzyskanego przy pomocy badaniu respirometrycznym. Stopień mineralizacji będzie więc mniejszy lub równy minimalnemu poziomowi ostatecznej biodegradacji. Aby uzyskać pełniejszy obraz ostatecznej biodegradacji (mineralizacji i włączenia do biomasy), na końcu badania należy przeprowadzić analizę rozkładu fazowego ^{14}C (zob. dodatek 1). ^{14}C w określonej puli składać się będzie z ^{14}C włączonego do bakteryjnej biomasy oraz ^{14}C zesorbowanego do cząstek organicznych.

2.3. WAŻNOŚĆ BADANIA

Jeżeli substancja odniesienia nie ulega degradacji w spodziewanym przedziale czasu (dla aniliny i benzoesanu sody zwykle krótszym niż dwa tygodnie), to ważność badania jest niepewna i musi zostać poddana dalszej weryfikacji lub, alternatywnie, badanie należy powtórzyć z nową próbką wody. W zgodnym z ISO pierścieniowym teście metody, w którym uczestniczyło siedem laboratoriów z całej Europy, dostosowane stałe szybkości degradacji dla aniliny wynosiły w granicach od 0,3 do 1,7 dzień$^{-1}$ ze średnią 0,8 d^{-1} w 20 °C i z błędem standardowym ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 dnia). Typowe czasy zastoju wynosiły 1–7 dni. Podano, że badane wody miały bakteryjną biomasę odpowiadającą 10^3–10^4 jednostek tworzących kolonię (CFU) na ml. Szybkości degradacji w bogatych w składniki odżywcze wodach środkowoeuropejskich były większe niż w skandynawskich wodach oligotroficznych, co może być spowodowane innym troficznym statusem lub uprzednią ekspozycją na substancje chemiczne.

Całkowity odzysk (bilans masy) na końcu doświadczenia powinien zawierać się w granicach 90–110 % dla substancji znakowanych izotopem promieniotwórczym, podczas gdy dla substancji nieznakowanych początkowy odzysk na początku doświadczenia powinien wynosić 70–110 %. Jednakże podane zakresy należy interpretować jedynie jako cele i nie należy używać ich jako kryteriów dla przyjęcia badania.

▼M1

3. **SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

W sprawozdaniu z badania należy wyraźnie podać typ badania, tj. czy jest to próba pelagiczna czy próba zawieszonego osadu, przy czym powinno ono również zawierać co najmniej następujące informacje:

Badana substancja i substancja(-e) odniesienia:

— nazwy pospolite, nazwy chemiczne (zalecane nazwy IUPAC i/lub CAS), numery CAS, wzory strukturalne (wskazujące położenie ^{14}C, jeśli użyta jest substancja znakowana izotopem promieniotwórczym) oraz stosowne własności fizykochemiczne badanej substancji i substancji odniesienia (zob. sekcje 1.5 i 1.6),

— nazwy chemiczne, numery CAS, wzory strukturalne (wskazujące położenie ^{14}C, jeśli użyta jest substancja znakowana izotopem promieniotwórczym) oraz stosowne własności fizykochemiczne substancji użytych jako wzorce do identyfikacji i kwantyfikacji produktów przemiany,

— czystość (zanieczyszczenia) badanej substancji i substancji odniesienia,

— radiochemiczna czystość znakowanej substancji chemicznej oraz aktywność właściwa (tam gdzie stosowne).

Woda powierzchniowa:

Należy podać, jako minimum, następujące informacje dotyczące próbki wody:

— lokalizacja i opis miejsca pobrania próbki, w tym, jeśli to możliwe, historia zanieczyszczenia,

— data i godzina pobrania próbki,

— składniki odżywcze (całkowity N, amon, azotyn, azotan, całkowity P, rozpuszczony ortofosforan),

— głębokość pobrania,

— wygląd próbki (np. barwa i mętność),

— RWO i TOC,

— BOD,

— temperatura i pH w miejscu oraz czas pobrania,

— potencjał tlenowy i redoks (obowiązkowy tylko wówczas, jeśli warunki aerobowe nie są oczywiste),

— zasolenie lub konduktywność (w przypadku wody morskiej lub słonawej),

— zawieszone cząstki stałe (w przypadku mętnej próbki),

— ewentualnie inne istotne informacje o miejscu próbkowania w czasie pobierania próbki (np. faktyczne lub historyczne dane dotyczące natężenia przepływu rzek lub prądów morskich, pobliskie ważniejsze odprowadzenia ścieków i ich typ, warunki atmosferyczne poprzedzające czas pobrania próbki),

oraz nieobowiązkowo:

— biomasę drobnoustrojów (np. bezpośrednią liczbę uzyskaną za pomocą oranżu akrydynowego lub jednostki tworzące kolonię),

▼M1

— węgiel nieorganiczny,

— stężenie chlorofilu a jako swoiste oszacowanie biomasy alg.

Ponadto należy podać następujące informacje o osadzie, jeśli przeprowadzona jest próba zawieszonego osadu:

— głębokość pobrania osadu,

— wygląd osadu (np. zabarwiony, szlamowaty, mulisty lub piaszczysty),

— struktura (np. % grubego piasku, drobnego piasku, mułu i gliny),

— ciężar suchej masy w g/l zawieszonych cząstek, stężenie TOC lub utrata ciężaru po zapłonie, jako miara zawartości materii organicznej,

— pH,

— potencjał tlenowy i redoks (obowiązkowy tylko wówczas, jeśli warunki aerobowe nie są oczywiste).

Warunki badania:

— upływ czasu od pobrania do użycia w badaniu laboratoryjnym, przechowywanie próbki i wstępna obróbka próbki, daty przeprowadzenia badań,

— ilość zastosowanej substancji badanej, stężenie próbne oraz substancja odniesienia,

— metoda wprowadzenia badanej substancji, w tym ewentualne użycie rozpuszczalników,

— objętość użytej wody powierzchniowej i osadu (jeśli jest użyty) oraz objętość pobrana każdorazowo do analizy,

— opis zastosowanego układu badawczego.

Jeśli nie mają być utrzymane warunki ciemności — informacje o warunkach „rozproszonego światła”,

— informacje o metodzie(-ach) zastosowanej do przygotowania sterylizowanych prób kontrolnych (np. temperatura, czas i ilość obróbek w autoklawie),

— temperatura inkubacji,

— informacje o analitycznych technikach i metodzie(-ach) zastosowanej/ych do pomiarów radiochemicznych oraz do sprawdzania bilansu masy i pomiarów rozkładu fazowego (jeśli jest przeprowadzony),

— liczba replikatów.

Wyniki:

— procenty odzysku (zob. sekcja 1.7.1),

— powtarzalność i czułość zastosowanych metod analitycznych, w tym granica wykrywalności (LOD) oraz granica kwantyfikacji (LOQ) (zob. sekcja 1.7.2),

▼M1

— wszystkie zmierzone dane (w tym punkty czasowe próbkowania) oraz obliczone wartości w postaci tabelarycznej i krzywych degradacji; dla każdego stężenia próbnego i dla każdej replikatowej kolby należy podać współczynnik korelacji liniowej dla nachylenia wykresu logarytmicznego, oszacowaną fazę zastoju oraz stałą szybkości pierwszego rzędu lub pseudo pierwszego rzędu (jeśli to możliwe) oraz odpowiadający jej czas półtrwania degradacji (lub okres półtrwania, t_{50}),

— podać stosowne wartości jako średnie z wyników zaobserwowanych w indywidualnych replikatach, np. długość fazy zastoju, stałą szybkości degradacji i czas półtrwania degradacji (lub t_{50}),

— określić kategorię układu, jako niezaadaptowany lub zaadaptowany, na podstawie wyglądu krzywej degradacji oraz na podstawie ewentualnego wpływu stężenia próbnego,

— wyniki końcowego sprawdzenia bilansu masy oraz wyniki pomiarów rozkładu fazowego (jeśli są wykonane),

— frakcja zmineralizowanego ^{14}C oraz, jeżeli zastosowane są specyficzne analizy, końcowy poziom pierwotnej degradacji,

— identyfikacja, molowe stężenie i procentowość zastosowanej badanej substancji oraz głównych produktów przemiany (zob. akapit pierwszy w sekcji 1.8.9.5), tam gdzie stosowne,

— proponowana droga przemiany, tam gdzie stosowne,

— omówienie wyników.

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) Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

(4) Testing Method 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 draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (to be published summer 2000).

▼**M1**

(9) Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization 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

Dodatek 1

Rozkład fazowy ^{14}C

Aby sprawdzić procedurę, rutynowe pomiary aktywności pozostałego całkowitego organicznego ^{14}C (TOA) należy uzupełnić pomiarami bilansu masy polegającymi na bezpośrednim wyznaczaniu wydzielonego $^{14}CO_2$ po wychwyceniu go w absorberze (zob. dodatek 3). Dodatnie wytworzenie się $^{14}CO_2$ samo w sobie jest bezpośrednim dowodem biodegradacji, w odróżnieniu od degradacji abiotycznej lub innych mechanizmów straty, takich jak ulatnianie się lub sorpcja. Dodatkowe użyteczne informacje charakteryzujące przebieg biodegradacji można uzyskać z pomiarów rozkładu TOA pomiędzy stan rozpuszczony (aktywność rozpuszczonego organicznego ^{14}C, DOA) a stan cząstkowy (aktywność cząstkowego organicznego ^{14}C, POA) po separacji cząstek stałych poprzez filtrację przeponową lub odwirowanie. Na POA składa się badana substancja zesorbowana na biomasie drobnoustrojów oraz na innych cząstkach, oraz węgiel badanej substancji, który został zużyty na syntezę nowego materiału komórkowego, a przez to włączony do frakcji biomasy cząstkowej. Utworzenie się rozpuszczonego materiału organicznego ^{14}C można oszacować jako DOA na końcu biodegradacji (plateau na krzywej zależności degradacji od czasu).

Oszacować rozkład fazowy resztkowego ^{14}C w wybranych próbkach przez przefiltrowanie próbek na filtrze przeponowym 0,22 μm lub 0,45 μm wykonanym z materiału, który nie adsorbuje znaczących ilości badanej substancji (odpowiednie mogą być filtry poliwęglanowe). Jeżeli sorpcja badanej substancji na filtrze jest zbyt duża, aby można było ją pominąć (należy to sprawdzić przed doświadczeniem), to zamiast filtracji można zastosować odwirowanie z wysoką prędkością (2 000 g; 10 min).

Postąpić z filtratem lub odwirowanym materiałem tak, jak opisano w dodatek 3 dla niefiltrowanych próbek. Rozpuścić filtry przeponowe w odpowiednim płynie scyntylacyjnym i wykonać zliczenie, jak zwykle, normalnie stosując tylko metodę stosunku zewnętrznego wzorca, aby dokonać poprawki wygaszania, bądź użyć utleniacza próbki. Jeżeli zastosowane zostało odwirowanie, to z grudki utworzonej z frakcji cząstkowej ponownie utworzyć zawiesinę w 1–2 ml wody destylowanej i przenieść do fiolki scyntylacyjnej. Następnie przemyć dwukrotnie 1 ml wody destylowanej i przenieść wodę płuczącą do fiolki. Jeśli to konieczne, zawiesinę można osadzić w żelu w celu wykonania cieczowego zliczenia scyntylacyjnego.

▼M1

Dodatek 2

Procedura półciągła

Może być konieczna przedłużona inkubacja trwająca do kilku miesięcy po to, aby osiągnąć degradację opornych substancji. Czas trwania badania normalnie nie powinien przekraczać 60 dni, chyba że cechy pierwotnej próbki wody są utrzymywane przez wymianę zawiesiny próbnej. Jednakże okres badania może być wydłużony do maksimum 90 dni bez wymiany zawiesiny próbnej, jeżeli degradacja badanej substancji rozpoczęła się w ciągu pierwszych 60 dni.

Podczas inkubacji przez długie okresy, różnorodność zespołu drobnoustrojów może ulec zmniejszeniu na skutek różnych mechanizmów straty oraz wskutek możliwego zmniejszania się w próbce wody ilości istotnych składników odżywczych i podstawowych substratów węglowych. Dlatego zaleca się, aby zastosować badanie półciągłe w celu zadowalającego wyznaczenia szybkości degradacji substancji wolno ulegających degradacji. Badanie należy rozpocząć przez zastosowanie procedury półciągłej, jeżeli — na podstawie wcześniejszego doświadczenia — spodziewane jest, że do osiągnięcia 20 % degradacji badanej substancji niezbędny jest okres inkubacji wynoszący trzy miesiące. Alternatywnie, normalne badanie prowadzone w systemie okresowym można zamienić na badanie półciągłe, jeżeli w ciągu około 60 dni badania z użyciem procedury okresowej nie osiągnięto degradacji badanej substancji. Procedurę półciągłą nożna zatrzymać i kontynuować badanie jako doświadczenie okresowe, gdy odnotuje się istotną degradację (np. > 20 %).

W badaniu półciągłym, co dwa tygodnie wymienia się około jedną trzecią objętości zawiesiny próbnej na świeżo pobraną wodę z badaną substancją, dodaną do początkowego stężenia. Podobnie, do wymiennej wody dodaje się osad do początkowego stężenia (0,01–1 g/l), jeżeli przeprowadza się dodatkowo próbę zawieszonego osadu. Przeprowadzając badanie z zawieszonymi cząstkami stałymi osadu, ważne jest, aby również podczas wymiany wody utrzymywać układ w stanie pełnego zawieszenia i aby czas przebywania był identyczny dla cząstek stałych i wody, gdyż w przeciwnym razie utracone zostanie zamierzone podobieństwo do jednorodnego układu wodnego bez ustalonych faz. Z tych względów, gdy stosowana jest procedura półciągła, preferowane jest początkowe stężenie zawieszonych osadów w dolnym przedziale wyznaczonego zakresu.

Zalecone dodanie badanej substancji oznacza, że początkowe stężenie badanej substancji nie zostaje przekroczone wskutek częściowej wymiany zawiesiny próbnej, a przez to unika się adaptacji, którą często obserwuje się przy wysokich stężeniach badanej substancji. Ponieważ procedura obejmuje zarówno ponowną inokulację, jak i kompensację wyczerpanych składników odżywczych i głównych substratów, zostaje przywrócona początkowa różnorodność zespołu drobnoustrojów, a czas trwania badania można w zasadzie wydłużać do nieskończoności. Gdy stosuje się procedurę półciągłą, należy pamiętać, że resztkowe stężenie badanej substancji musi być skorygowane pod względem dodanych lub usuniętych ilości badanej substancji podczas każdej procedury wymiany. Stężenie całkowitej i rozpuszczonej badanej substancji może być używane zamiennie w przypadku związków mało sorbujących. Sorpcja jest nieznacząca (< 5 %) w określonych warunkach (0,1–1 g cząstek stałych/l) dla substancji o log Kow < 3 (ważne dla związków obojętnych, lipofilowych). Ilustruje to następujący przykład obliczeniowy. 0,1 g/l cząstek stałych w przybliżeniu odpowiada 10 mg węgla na litr (ułamek węgla, $f_C = 0{,}01$). Zakładając, że:

Log K_{ow} (badanej substancji) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Współczynnik podziału, $K_d = f_C \times K_{oc}$

zatem, rozpuszczony ułamek całkowitego stężenia (C-woda (C_w)/C-całkowity (C_t)) wynosi:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Dodatek 3

Oznaczanie $^{14}CO_2$

Pośrednie oznaczanie $^{14}CO_2$

Dla rutynowych pomiarów metoda pośrednia jest zwykle najmniej czasochłonną i najbardziej dokładną metodą, jeżeli badana substancja jest nielotna i nie zamienia się w lotne produkty przemiany. Należy jedynie przenieść niefiltrowane próbki, o objętości np. 5 ml, do fiolek scyntylacyjnych. Odpowiednia aktywność w próbkach wynosi początkowo 5 000–10 000 dpm (80–170 Bq), a minimalna początkowa aktywność wynosi około 1 000 dpm. CO_2 należy usunąć po zakwaszeniu do pH 2–3 przy pomocy 1–2 kropli stężonego H_3PO_4 lub HCl. Usunięcia CO_2 można dokonać poprzez barbotowanie powietrzem przez około ½–1 godziny. Alternatywnie fiolki można energicznie wstrząsać przez 1–2 godziny (na przykład na wstrząsarce mikropłytowej) lub, stosując łagodniejsze wstrząsanie, pozostawić na noc. Należy sprawdzić efektywność procedury usuwania CO_2 (przez przedłużenie okresu napowietrzania lub wstrząsania). Następnie należy dodać ciecz scyntylacyjną odpowiednią do zliczania próbek wodnych, ujednorodnić próbkę na mieszadle wirowym i wyznaczyć radioaktywność za pomocą cieczowego zliczania scyntylacyjnego, odejmując aktywność tła stwierdzoną w ślepych próbach (F_B). O ile badana woda nie jest silnie zabarwiona lub nie zawiera wysokiego stężenia cząstek stałych, próbki zwykle będą wykazywać równomierne wygaszanie i wystarczające będzie wykonanie poprawek wygaszania przy użyciu zewnętrznego wzorca. Jeżeli badana woda jest silnie zabarwiona, to konieczna może być poprawka wygaszania poprzez dodanie wewnętrznego wzorca. Jeśli stężenie cząstek stałych jest wysokie, to może nie być możliwe uzyskanie jednorodnego roztworu lub żelu bądź też może występować duża zmienność wygaszania pomiędzy próbkami. W takim przypadku można użyć metody zliczania opisanej poniżej dla szlamów próbnych. Jeżeli badanie przeprowadza się jako próbę zawieszonego osadu, to pomiar $^{14}CO_2$ można wykonać pośrednio, pobierając jednorodną próbkę 10 ml badanej wody/zawiesiny i rozdzielając fazy przez odwirowanie z odpowiednią prędkością (np. 40 000 m/s^2 przez 15 min). Fazę wodną należy następnie potraktować, jak opisano powyżej. Aktywność ^{14}C w fazie cząstkowej (POA) należy wyznaczyć przez ponowne sporządzenie zawiesiny osadu w niewielkiej objętości wody destylowanej, przeniesienie jej do fiolek scyntylacyjnych i dodanie cieczy scyntylacyjnej w celu utworzenia żelu (do tego celu dostępne są specjalne ciecze scyntylacyjne). W zależności od charakteru cząstek (np. zawartości w nich materiału organicznego), może być możliwe roztworzenie próbki przez noc za pomocą solubilizatora tkankowego, a następnie ujednorodnienie na mieszadle wirowym przed dodaniem cieczy scyntylacyjnej. Alternatywnie POA można wyznaczyć przez spalenie w nadmiarze tlenu, używając utleniacza próbek. Podczas zliczania należy zawsze włączyć wewnętrzne wzorce, a także może być niezbędne dokonanie korekt wygaszania przy użyciu dodatku wewnętrznego wzorca dla każdej indywidualnej próbki.

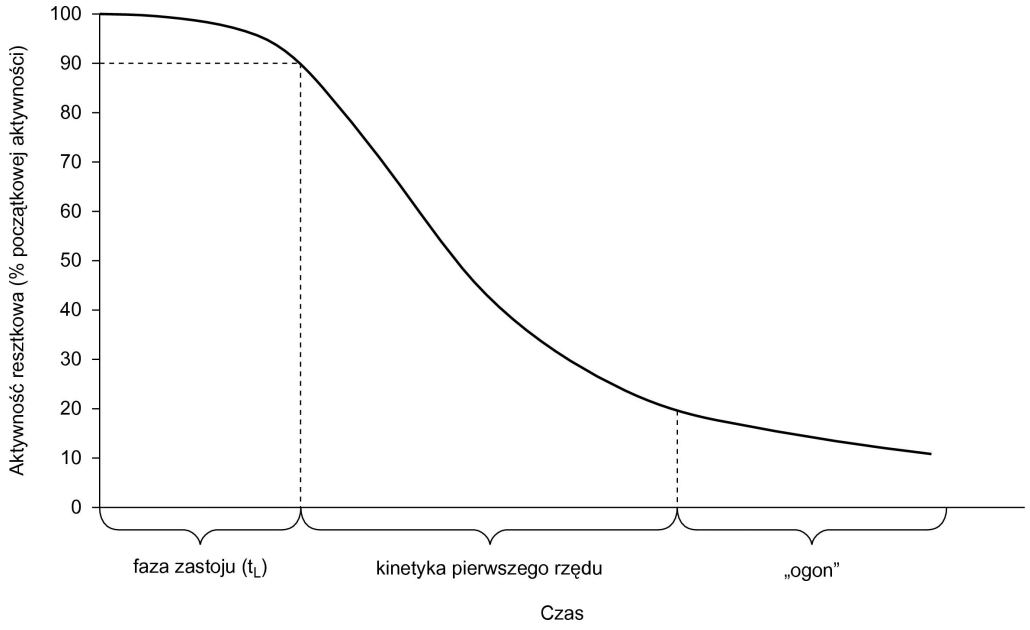
Bezpośrednie oznaczanie $^{14}CO_2$

Jeżeli wydzielony $^{14}CO_2$ mierzy się bezpośrednio, to należy to wykonać, przygotowując na początku badania większą ilość kolb, zbierając kolby próbne w każdym punkcie pomiaru przez zakwaszenie kolb próbnych do pH 2–3 i wychwycenie $^{14}CO_2$ w wewnętrznym (umieszczonym w każdej kolbie próbnej na początku badania) lub zewnętrznym absorberze. Jako czynnika absorbującego można użyć absorbera alkalicznego (np. 1 N roztwór NaOH lub tabletki NaOH), atanolaminy lub absorbera na jej bazie lub absorbery dostępne w handlu. Do bezpośrednich pomiarów $^{14}CO_2$, kolby powinny być zamknięte np. za pomocą przykrywki z gumy butylowej.

▼**M1**

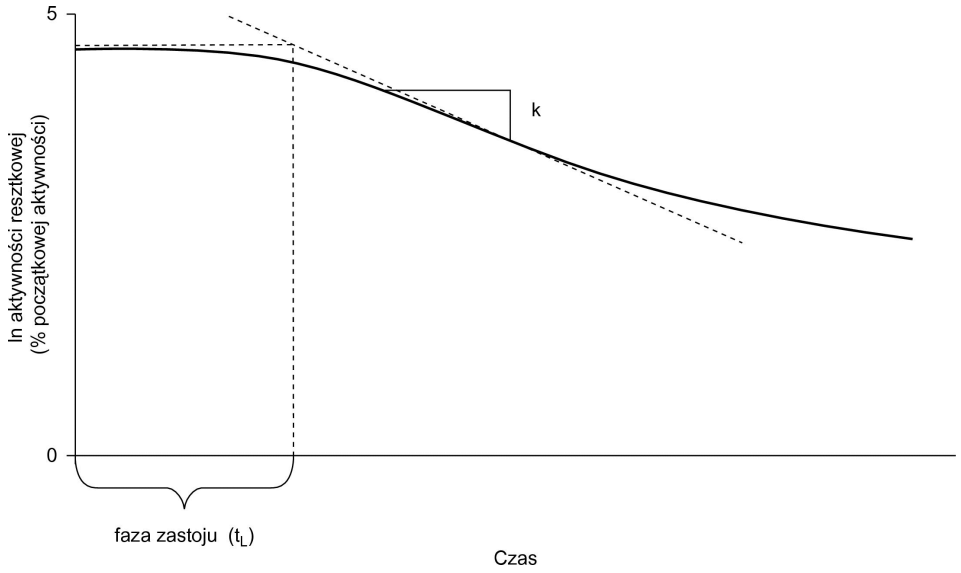
Rysunek 1a

Przykład arytmetycznego wykresu danych (aktywność resztkowa w zależności od czasu)



Rysunek 1b

Przykład półlogarytmicznego wykresu plot danych (ln z aktywności resztkowej w zależności od czasu)



▼M6

C.26. BADANIE ZAHAMOWANIA WZROSTU U GATUNKÓW LEMNA

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 221 (2006). Służy ona do oceny toksyczności substancji chemicznych w stosunku do roślin słodkowodnych rodzaju *Lemna* (rzęsy wodnej). Jej podstawę stanowią istniejące metody (1)(2)(3)(4)(5)(6), lecz obejmuje modyfikacje tych metod, uwzględniające najnowsze badania i konsultacje w sprawie szeregu zasadniczych kwestii. Niniejsza metoda badawcza została potwierdzona za pomocą międzynarodowego badania międzylabolatoryjnego (7).

2. Niniejsza metoda badawcza opisuje gatunki *Lemna gibba* i *Lemna minor*, z których obydwa zostały dogłębnie zbadane i są przedmiotem przywołanych wyżej norm. Taksonomia gatunków *Lemna* jest trudna, gdyż komplikuje ją istnienie wielu różnych fenotypów. Choć w przypadku *Lemna* może występować genetyczna zmienność pod względem reakcji na czynniki toksyczne, to obecnie istnieje zbyt mało danych na temat tego źródła zmienności, aby można było zalecić określony klon do użycia wykorzystania w ramach niniejszej metody badawczej. Należy zwrócić uwagę, że badanie nie jest przeprowadzane na kulturach aksenicznych, ale na poszczególnych etapach procedury badawczej podejmowane są kroki w celu ograniczenia zanieczyszczenia innymi organizmami do minimum.

3. Opisano szczegóły badania z wymianą (badanie półstatyczne i przepływowe) i bez wymiany (badanie statyczne) roztworu do badań. W zależności od celów badania oraz od wymogów regulacyjnych zaleca się rozważyć zastosowanie metody półstatycznej i przepływowej, np. w przypadku substancji chemicznych, które są szybko tracone z roztworu na skutek ulatniania się, fotodegradacji, strącania lub biodegradacji. Dalsze wskazówki przedstawiono w (8).

4. Zastosowane definicje są podane w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

5. Rozrastającym się wykładniczo kulturom roślinnym rodzaju *Lemna* umożliwia się wzrost w postaci monokultur z udziałem różnych stężeń badanej substancji chemicznej przez okres siedmiu dni. Celem badania jest ilościowe określenie oddziaływań substancji chemicznej na wegetatywny wzrost w tym okresie na podstawie ocen wybranych zmiennych pomiarowych. Główną zmienną pomiarową jest liczba liści. Mierzy się również co najmniej jedną inną zmienną pomiarową (całkowitą powierzchnię liści, suchą masę lub mokrą masę), gdyż niektóre substancje chemiczne mogą wpływać w o wiele większym stopniu na inne zmienne pomiarowe niż na liczbę liści. Aby określić ilościowo skutki związane z substancją chemiczną, wzrost w roztworach do badań porównuje się ze wzrostem w grupach kontrolnych i wyznacza się stężenie powodujące zahamowanie wzrostu o określone x % (np. 50 %) i wyraża się je jako EC_x (np. EC_{50}).

6. Punktem końcowym badania jest zahamowanie wzrostu wyrażone jako logarytmiczny przyrost zmiennej pomiarowej (średnia właściwa szybkość wzrostu) w okresie narażenia. Na podstawie średniej właściwej szybkości wzrostu zarejestrowanej w serii roztworów do badań wyznacza się stężenie powodujące zahamowanie szybkości wzrostu o określoną wartość procentową (np. 50 %) i wyraża się je jako E_rC_x (np. E_rC_{50}).

7. Dodatkową zmienną zależną użytą w niniejszej metodzie badawczej jest przyrost, który może być potrzebny do spełnienia określonych wymogów regulacyjnych w niektórych krajach. Jest on zdefiniowany jako zmienne pomiarowe na końcu okresu narażenia minus zmienne pomiarowe na początku okresu narażenia. Na podstawie uzysku zarejestrowanego w serii roztworów do badań oblicza się stężenie powodujące zahamowanie przyrostu o określone x % (np. 50 %) i wyraża się je jako E_yC_x (np. E_yC_{50}).

▼M6

8. Ponadto można statystycznie określić najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), oraz stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

9. Należy dysponować metodą analityczną zapewniającą należytą czułość pozwalającą na ilościowe oznaczenie substancji chemicznej w pożywce.

10. Informacje na temat badanej substancji chemicznej, które mogą być przydatne przy ustalaniu warunków badania, obejmują wzór strukturalny, czystość, rozpuszczalność w wodzie, stabilność w wodzie i świetle, stałą dysocjacji, K_{ow} prężność pary oraz biodegradowalność. Rozpuszczalność w wodzie i prężność pary mogą posłużyć do obliczenia stałej Henry'ego, która wskaże, czy istnieje prawdopodobieństwo znaczących strat badanej substancji chemicznej w okresie badania. Pomoże to stwierdzić, czy należy podjąć szczególne działania w celu ograniczenia takich strat. W przypadku gdy dane dotyczące rozpuszczalności i stabilności badanej substancji chemicznej są niepewne, zaleca się oceniać je w warunkach badania, tj. uwzględniając pożywkę, temperaturę i warunki oświetlenia, które mają być zastosowane w badaniu.

11. Jeżeli szczególnie ważna jest kontrola pH pożywki, np. gdy bada się metale lub substancje chemiczne, które są hydrolitycznie nietrwałe, zaleca się dodać do pożywki roztwór buforowy (zob. pkt 21). Dalsze wskazówki dotyczące badania substancji chemicznych o własnościach fizykochemicznych, które utrudniają ich badanie, podano w (8).

WAŻNOŚĆ BADANIA

12. Aby badanie było ważne, czas podwojenia liczby liści w próbie kontrolnej musi być krótszy niż 2,5 dnia (60 godz.), co odpowiada w przybliżeniu siedmiokrotnemu wzrostowi w ciągu siedmiu dni oraz średniej właściwej szybkości wzrostu wynoszącej 0,275 d^{-1}. W przypadku zastosowania pożywki i warunków badania opisanych w niniejszej metodzie badawczej, kryterium to można spełnić, stosując warunki badania statycznego (5). Przewiduje się również, że kryterium to będzie możliwe do spełnienia w warunkach badania półstatycznego i przepływowego. Obliczenie czasu podwojenia przedstawiono w pkt 49.

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

13. Sposobem sprawdzenia procedury badania może być zbadanie substancji chemicznych odniesienia, takich jak 3,5-dichlorofenol stosowany w międzynarodowym badaniu międzylaboratoryjnym (7). Wskazane jest badanie chemicznej substancji odniesienia co najmniej dwa razy do roku lub równolegle z określaniem toksyczności badanej substancji chemicznej, gdy badanie jest wykonywane z mniejszą częstotliwością.

OPIS METODY

Aparatura

14. Cały sprzęt mający kontakt z pożywkami musi być wykonany ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału. Szklane naczynia używane do hodowli kultur i badania powinny być pozbawione zanieczyszczeń chemicznych, które mogłyby zostać wypłukane do pożywki, oraz powinny być sterylne. Naczynia badawcze powinny mieć dostateczną szerokość, aby liście różnych kolonii w naczyniach kontrolnych urosły bez zachodzenia na siebie na końcu badania. Nie ma znaczenia, czy korzenie dotykają dna naczyń badawczych, lecz zaleca się minimalną głębokość 20 mm i minimalną objętość 100 ml w każdym naczyniu badawczym. Wybór naczyń badawczych nie ma szczególnie dużego znaczenia, o ile spełnione są te wymagania. Odpowiednie okazały się szklane zlewki, krystalizatory lub szalki Petriego

▼M6

o odpowiednich wymiarach. Naczynia badawcze muszą być przykryte, aby ograniczyć do minimum parowanie i przypadkowe zanieczyszczenie, a jednocześnie umożliwić niezbędną wymianę powietrza. Odpowiednie naczynia badawcze, a w szczególności pokrywy, nie powinny umożliwiać zacienienia lub zmian charakterystyki widmowej światła.

15. Kultury i naczynia badawcze nie powinny być trzymane razem. Najłatwiej to osiągnąć, używając oddzielnych komór wzrostowych, inkubatorów lub pomieszczeń. Oświetlenie i temperatura muszą być regulowane i utrzymywane na stałym poziomie (zob. pkt 35–36).

Organizm użyty do badania

16. Organizmem użytym do niniejszego badania jest *Lemna gibba* lub *Lemna minor*. Krótkie opisy gatunków rzęsy wodnej, których użyto do badania toksyczności, zamieszczono w dodatku 2. Materiał roślinny można uzyskać ze zbiorów kultur, z innego laboratorium lub z terenu. Jeżeli rośliny zostały zebrane w terenie, przed użyciem należy je hodować przez co najmniej osiem tygodni w tej samej pożywce, co używana do badania. Miejsca w terenie wykorzystane do zebrania kultur wyjściowych muszą być wolne od ewidentnych źródeł zanieczyszczenia. Jeżeli zostały uzyskane z innego laboratorium lub innego zbioru kultur, należy je przechowywać w podobnych warunkach przez co najmniej trzy tygodnie. W sprawozdaniu należy zawsze podać źródło materiału roślinnego oraz gatunek i klon (jeśli jest znany) użyty w badaniu.

17. Należy używać monokultur, które są w sposób widoczny wolne od zanieczyszczenia innymi organizmami, takimi jak glony i pierwotniaki. Zdrowe rośliny *L. minor* składać się będą z kolonii zawierających od dwóch do pięciu liści, natomiast zdrowe kolonie *L. gibba* mogą mieć do siedmiu liści.

18. Jakość i jednorodność roślin użytych do badania będzie mieć znaczący wpływ na jego wynik i dlatego należy je starannie wybierać. Należy używać młodych, szybko rosnących roślin bez widocznych uszkodzeń lub odbarwień (chlorozy). O dobrej jakości kultur świadczy duża częstość występowania kolonii zawierających co najmniej dwa liście. Duża liczba pojedynczych liści oznacza stres środowiskowy, np. niedobór składników odżywczych, i materiału roślinnego z takich kultur nie należy używać do badania.

Hodowla

19. Aby zmniejszyć częstotliwość prac w zakresie utrzymania kultur (np. gdy przez pewien okres nie planuje się badań nad *Lemna*), kultury można utrzymywać w warunkach słabszego oświetlenia i obniżonej temperatury (4–10 °C). Szczegóły dotyczące kultury podano w dodatku 3. Wyraźne oznaki zanieczyszczenia glonami lub innymi organizmami mogą wymagać powierzchniowej sterylizacji podpróbki liści *Lemna*, a następnie przeniesienia jej do świeżej pożywki (zob. dodatek 3). W takim przypadku pozostałą zanieczyszczoną kulturę należy odrzucić.

20. Co najmniej siedem dni przed badaniem dostateczną ilość kolonii przenosi się aseptycznie do świeżej sterylnej pożywki i przez 7–10 dni hoduje się kulturę w warunkach badania.

Pożywka

21. Dla *Lemna minor* i *Lemna gibba* zalecane są różne pożywki, jak opisano poniżej. Należy starannie rozważyć włączenie bufora pH do pożywki (MOPS (kwasu 4-morfolinopropanosulfonowego, nr CAS 1132-61-2) w pożywce *L. minor* oraz $NaHCO_3$ w pożywce *L. gibba*), gdy podejrzewa się, że mógłby on reagować z badaną substancją chemiczną i wpłynąć na wyrażenie jej toksyczności. Dopuszczalna jest również pożywka Steinberga (9), o ile spełnione są kryteria ważności.

▼M6

22. Do hodowli kultur i badania *L. minor* zalecana jest modyfikacja pożywki *Lemna* według normy szwedzkiej (SIS). Skład tej pożywki podano w dodatku 4.

23. Do hodowli kultur i badania *L. gibba* zaleca się pożywkę 20X AAP, opisaną w dodatku 4.

24. Pożywka Steinberga, opisana w dodatku 4, jest również odpowiednia dla *L. minor*, lecz może być także użyta do *L. gibba*, o ile spełnione są kryteria ważności.

Roztwory do badań

25. Roztwory do badań przygotowuje się zazwyczaj przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej przygotowuje się zwykle przez rozpuszczenie substancji w pożywce.

26. Najwyższe badane stężenie badanej substancji chemicznej zwykle nie powinno przekraczać rozpuszczalności tej substancji w wodzie w warunkach badania. Należy jednak zauważyć, że gatunki *Lemna* unoszą się na powierzchni i mogą być wystawione na działanie substancji chemicznych, które gromadzą się na granicy faz woda-powietrze (jak np. substancje słabo rozpuszczalne w wodzie lub hydrofobowe bądź substancje powierzchniowo czynne). W takiej sytuacji narażenie będzie skutkiem oddziaływania substancji innej niż będąca w roztworze i badane stężenia mogą, w zależności od charakterystyki badanej substancji chemicznej, przekroczyć rozpuszczalność w wodzie. W przypadku substancji chemicznych o niskiej rozpuszczalności w wodzie może być konieczne przygotowanie stężonego roztworu podstawowego lub dyspersji substancji chemicznej z użyciem rozpuszczalnika organicznego lub środka dyspergującego, aby ułatwić dodanie precyzyjnych ilości substancji chemicznej do pożywki oraz jej dyspersję i rozpuszczenie. Należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć użycia takich materiałów. Użycie pomocniczych rozpuszczalników lub środków dyspergujących nie powinno powodować fitotoksyczności. Na przykład do powszechnie używanych rozpuszczalników, które nie powodują fitotoksyczności w stężeniach do 100 µl/l, należą aceton i dimetyloformamid. W przypadku użycia rozpuszczalnika lub środka dyspergującego w sprawozdaniu należy podać jego końcowe stężenie, które powinno być utrzymane na minimalnym poziomie (≤100 µl/l) i we wszystkich grupach badanych i grupach kontrolnych należy zachować takie samo stężenie rozpuszczalnika lub środka dyspergującego. Dalsze wskazówki na temat użycia środków dyspergujących podano w (8).

Grupy badane i kontrolne

27. W doborze odpowiednich badanych stężeń pomocna będzie uprzednia znajomość toksyczności badanej substancji chemicznej w stosunku do *Lemna*, np. z badania ustalającego zakres. W ostatecznym badaniu toksyczności powinno zwykle być co najmniej pięć badanych stężeń uporządkowanych w postaci szeregu geometrycznego. Współczynnik rozdziału pomiędzy badanymi stężeniami w miarę możliwości nie powinien przekraczać 3,2, lecz można zastosować większą wartość, jeżeli krzywa stężenie-odpowiedź jest płaska. Jeżeli użyto mniej niż pięć stężeń, należy podać uzasadnienie. Przy każdym badanym stężeniu należy zastosować co najmniej trzy kontrpróby.

28. Przy ustalaniu zakresu badanych stężeń (w przypadku badania ustalającego zakres lub ostatecznego badania toksyczności) należy wziąć pod uwagę, co następuje:

— aby określić EC_x, badane stężenia powinny obejmować swoim zakresem wartość EC_x w celu zapewnienia odpowiedniego poziomu ufności. Na przykład jeżeli oszacowuje się EC_{50}, to najwyższe badane stężenie nie powinno być większe od wartości EC_{50}. Jeżeli wartość EC_{50} leży poza zakresem badanych stężeń, to związane z tym przedziały ufności będą większe i odpowiednia ocena statystycznego dopasowania modelu może nie być możliwa;

— jeżeli celem jest oszacowanie LOEC/NOEC, to najniższe badane stężenie powinno być dostatecznie niskie, aby wzrost nie był znacząco mniejszy niż wzrost w grupie kontrolnej. Ponadto najwyższe badane stężenie powinno być dostatecznie wysokie, aby wzrost był znacząco mniejszy

▼M6

niż w grupie kontrolnej. Jeśli jest inaczej, badanie musi zostać powtórzone przy zastosowaniu innego zakresu stężeń (chyba że najwyższe stężenie równe jest granicznej rozpuszczalności lub maksymalnemu wymaganemu stężeniu granicznemu np. 100 mg/l).

29. Każde badanie powinno obejmować grupy kontrolne zawierające taką samą pożywkę, liczbę liści i kolonii, warunki otoczenia i procedury jak naczynia badawcze, lecz bez badanej substancji chemicznej. Jeżeli użyty jest pomocniczy rozpuszczalnik lub środek dyspergujący, należy włączyć dodatkową grupę kontrolną z obecnością rozpuszczalnika/środka dyspergującego o tym samym stężeniu co w naczyniach z badaną substancją chemiczną. Liczba naczyń kontrolnych z kontrpróbą (oraz, w stosownym wypadku, naczyń z rozpuszczalnikiem) powinna być co najmniej równa, a najlepiej dwukrotnie większa od liczby naczyń użytych do każdego badanego stężenia.

30. Jeżeli wyznaczenie NOEC nie jest wymagane, projekt badania można zmienić, zwiększając liczbę stężeń i zmniejszając liczbę kontrprób przypadających na stężenie. Muszą być jednak zastosowane co najmniej trzy kontrpróby.

Narażenie

31. Kolonie składające się z 2–4 widocznych liści przenosi się z kultury inokulum i losowo przydziela do naczyń badawczych w warunkach aseptycznych. Każde naczynie badawcze powinno zawierać łącznie 9–12 liści. Liczba liści i kolonii powinna być taka sama w każdym naczyniu. Jak wynika z doświadczenia uzyskanego dzięki tej metodzie oraz z danych z badania międzylaboratoryjnego, użycie trzech kontrprób na zabieg, przy czym każda kontrpróba zawiera początkowo 9–12 liści, jest wystarczające do wykrycia różnic we wzroście wynoszących w przybliżeniu 4–7 % zahamowania obliczonego na podstawie szybkości wzrostu (10–15 % w przypadku obliczenia na podstawie przyrostu) pomiędzy zabiegami (7).

32. Wymagany jest randomizowany układ rozmieszczenia naczyń badawczych w inkubatorze, aby ograniczyć do minimum wpływ przestrzennych różnic natężenia światła i temperatury. Podczas dokonywania obserwacji wymagany jest również zblokowany układ lub losowe przestawianie naczyń (albo ich częstsze przestawianie).

33. Jeżeli wstępny test stabilności wykazuje, że nie można utrzymać stężenia badanej substancji chemicznej (tj. mierzone stężenie spada poniżej 80 % zmierzonego początkowego stężenia) w czasie trwania badania (7 dni), zalecane są warunki badania półstatycznego. W takim przypadku kolonie należy wystawić na działanie świeżo przygotowanych roztworów do badań i roztworów kontrolnych co najmniej dwukrotnie w trakcie badania (np. w 3. i 5. dniu). Częstotliwość narażenia na świeżą pożywkę będzie zależeć od stabilności badanej substancji chemicznej; do utrzymania prawie stałych stężeń wysoce nietrwałych lub lotnych substancji chemicznych może być wymagana większa częstotliwość. W niektórych sytuacjach może być konieczna procedura przepływowa (8)(10).

34. Scenariusz narażenia poprzez nałożenie na liście (natrysk) nie jest objęty niniejszą metodą badawczą; natomiast zob. (11).

Warunki inkubacji

35. Należy zastosować ciągłe oświetlenie w postaci ciepłego lub chłodnego białego światła fluorescencyjnego o natężeniu wybranym z zakresu 85–135 mE $\cdot m^{-2}s^{-1}$, mierzonym w promieniowaniu fotosyntetycznie czynnym (400–700 nm) w punktach o takiej samej odległości od źródła światła co liście *Lemna* (równoważnym 6 500–10 000 luksów). Wszelkie różnice w stosunku do wybranego natężenia światła na badanej powierzchni nie powinny przekraczać ± 15 %. Na wartość pomiarową będzie mieć wpływ

▼M6

metoda detekcji i pomiaru światła, w szczególności typ czujnika. Nad czujniki jednokierunkowe przedkładane są czujniki sferyczne (które reagują na światło padające pod wszystkimi kątami powyżej i poniżej płaszczyzny pomiaru) oraz czujniki „kosinusowe” (które reagują na światło padające pod wszystkimi kątami powyżej płaszczyzny pomiaru) i dają wyższe odczyty w przypadku opisywanego tu typu wielopunktowego źródła światła.

36. Temperatura w naczyniach badawczych powinna wynosić 24 ± 2 °C. Wartość pH pożywki kontrolnej nie powinna wzrosnąć w trakcie badania o więcej niż 1,5 jednostki. Jednakże odchylenie o więcej niż 1,5 jednostki nie spowoduje unieważnienia badania, jeśli można wykazać, że spełnione są kryteria ważności. Dodatkowej uwagi wymaga dryft pH w szczególnych przypadkach, takich jak podczas badania nietrwałych substancji lub metali. Dalsze wskazówki przedstawiono w (8).

Czas trwania

37. Badanie zostaje zakończone po 7 dniach od przeniesienia roślin do naczyń badawczych.

Pomiary i oznaczenia analityczne

38. Na początku badania liczy się i rejestruje liczbę liści w naczyniach badawczych, zwracając uwagę na uwzględnienie wystających, wyraźnie widocznych liści. Liczbę liści, które wyglądają normalnie albo nienormalnie, należy określić na początku badania, co najmniej raz na 3 dni w ciągu okresu narażenia (tj. co najmniej 2 razy podczas 7-dniowego okresu) oraz na zakończenie badania. Należy odnotować zmiany w rozwoju roślin, np. pod względem wielkości liści, wyglądu, oznak martwicy, chlorozy lub garbatości, rozpadu kolonii lub utraty zdolności utrzymywania się na powierzchni wody oraz długości i wyglądu korzeni. Należy również odnotować istotne cechy pożywki (np. obecność nierozpuszczonej substancji, wzrost glonów w naczyniu badawczym).

39. Oprócz określenia liczby liści w trakcie badania ocenia się również wpływ badanej substancji chemicznej na jedną (lub więcej) z następujących zmiennych pomiarowych:

(i) całkowitą powierzchnię liści;

(ii) suchą masę;

(iii) mokrą masę.

40. Całkowita powierzchnia liści ma tę zaletę, że może być określona dla każdego naczynia badawczego i kontrolnego na początku, w trakcie i na koniec badania. Suchą lub mokrą masę należy określić na początku badania na podstawie próbki kultury inokulum reprezentatywnej dla tego, co jest użyte do rozpoczęcia badania, oraz na końcu badania przy użyciu materiału roślinnego z każdego naczynia badawczego i kontrolnego. Jeśli nie mierzy się powierzchni liści, to suchą masę przedkłada się nad mokrą masę.

41. Całkowitą powierzchnię liści, suchą masę i mokrą masę można wyznaczyć następująco:

(i) *całkowita powierzchnia liści:* całkowitą powierzchnię liści wszystkich kolonii można określić za pomocą analizy obrazu. Sylwetkę naczynia badawczego i roślin można uchwycić za pomocą kamery wideo (np. ustawiając naczynie na kopioramie), a otrzymany w wyniku obraz poddać digitalizacji. Kalibrując za pomocą płaskich kształtów o znanej powierzchni, można następnie wyznaczyć całkowitą powierzchnię liści w naczyniu badawczym. Należy pamiętać, aby wykluczyć interferencję spowodowaną przez obrzeże naczynia badawczego. Alternatywne, choć bardziej pracochłonne podejście polega na wykonaniu fotokopii wszystkich naczyń badawczych i roślin, wycięciu otrzymanej sylwetki kolonii i wyznaczeniu ich powierzchni przy użyciu analizatora powierzchni liści lub papieru milimetrowego. Odpowiednie mogą być również inne techniki (np. określenie stosunku ciężaru papieru z wyciętą powierzchni sylwetki kolonii do ciężaru papieru o powierzchni jednostkowej);

▼M6

(ii) *sucha masa:* z każdego naczynia badawczego zbiera się wszystkie kolonie i przepłukuje wodą destylowaną lub dejonizowaną. Odsącza się je na bibule w celu usunięcia nadmiaru wody, a następnie suszy w temperaturze 60 °C do stałej masy. Należy dołączyć fragmenty korzeni. Suchą masę należy wyrazić z dokładnością do co najmniej 0,1 mg;

(iii) *mokra masa:* wszystkie kolonie przenosi się do uprzednio zważonych probówek z polistyrenu (lub innego obojętnego materiału) z małymi (1 mm) otworami w zaokrąglonym dnie. Następnie probówki odwirowuje się z prędkością 3 000 obr./min przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Probówki zawierające wysuszone kolonie ponownie waży się i oblicza się mokrą masę przez odjęcie ciężaru pustej probówki.

Częstotliwość pomiarów i oznaczeń analitycznych

42. Jeżeli zastosowany jest układ statyczny, należy zmierzyć pH każdego zabiegu na początku i na końcu badania. Jeżeli zastosowany jest układ półstatyczny, należy zmierzyć pH w każdej partii „świeżego” roztworu do badań przed każdą wymianą oraz w odpowiednich „zużytych” roztworach.

43. Natężenie światła należy zmierzyć w komorze wzrostowej, inkubatorze lub pomieszczeniu w różnych punktach o takiej samej odległości od źródła światła co liście *Lemna*. Pomiaru należy dokonać co najmniej raz w trakcie badania. Temperaturę pożywki w naczyniu zastępczym utrzymywanym w takich samych warunkach w komorze wzrostowej, inkubatorze lub pomieszczeniu należy rejestrować co najmniej raz dziennie.

44. Podczas badania w odpowiednich odstępach czasu oznacza się stężenia badanej substancji chemicznej. W badaniach statycznych minimalnym wymogiem jest oznaczenie stężeń na początku i na końcu badania.

45. W badaniach półstatycznych, w przypadku których nie oczekuje się, że stężenie badanej substancji chemicznej utrzyma się w granicach ± 20 % stężenia nominalnego, niezbędne jest objęcie analizą wszystkich świeżo przygotowanych roztworów do badań oraz tych samych roztworów przy każdej wymianie (zob. pkt 33). Jednakże w przypadku tych badań, w których zmierzone początkowe stężenie badanej substancji chemicznej nie mieści się w granicach ± 20 % stężenia nominalnego, lecz można dostarczyć dostatecznych dowodów wykazujących, że początkowe stężenia są powtarzalne i stabilne (tj. zawierają się w granicach 80–120 % początkowego stężenia), oznaczenia chemiczne można przeprowadzać tylko na najwyższych i najniższych badanych stężeniach. We wszystkich przypadkach oznaczenie stężeń badanej substancji chemicznej przed wymianą musi być wykonywane tylko na jednym naczyniu z kontrpróbą przy każdym badanym stężeniu (lub na połączonych zawartościach naczyń z kontrpróbą).

46. W przypadku zastosowania badania przepływowego odpowiednim systemem jest system pobierania próbek podobny do opisanego dla badań półstatycznych, wraz z analizą na początku, w trakcie i na końcu badania, lecz w tym przypadku pomiar „zużytych” roztworów nie jest odpowiedni. W tego typu badaniu należy codziennie sprawdzać natężenie przepływu rozcieńczalnika i badanej substancji chemicznej lub roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej.

47. Jeżeli istnieją dowody, że stężenie badanej substancji chemicznej zostało zadowalająco utrzymane w granicach ± 20 % nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia w ciągu całego badania, to analizę wyników można oprzeć na nominalnych lub zmierzonych początkowych wartościach. Jeśli odchylenie od nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia nie mieści się w zakresie ± 20 %, to analizę wyników należy oprzeć na średnim geometrycznym stężeniu w ciągu narażenia lub na modelach opisujących spadek stężenia badanej substancji chemicznej (8).

▼M6

Badanie graniczne

48. W niektórych okolicznościach, na przykład gdy badanie wstępne wskazuje, że badana substancja chemiczna nie ma skutków toksycznych w stężeniach do 100 mg/l lub do jej rozpuszczalności granicznej w pożywce (w zależności od tego, która wartość jest niższa), można przeprowadzić badanie graniczne polegające na porównaniu reakcji w grupie kontrolnej i jednej grupie badanej (o stężeniu 100 mg/l lub równym granicznej rozpuszczalności). Zdecydowanie zaleca się, aby takie badanie było poparte analizą stężenia ekspozycyjnego. Do badania granicznego stosują się wszystkie wcześniej opisane warunki badania i kryteria ważności, z tym że liczba kontrprób poddawanych zabiegowi powinna zostać podwojona. Wzrost w grupie kontrolnej i grupie badanej można poddać analizie przy użyciu testu statystycznego do porównywania średnich, np. testu t-Studenta.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Czas podwojenia

49. Aby określić czas podwojenia *(T_d)* liczby liści oraz spełnienie przez badanie niniejszego kryterium ważności (pkt 12), używa się poniższego wzoru z danymi uzyskanymi z naczyń kontrolnych:

$$T_d = \ln 2/m$$

gdzie m jest średnią właściwą szybkością wzrostu wyznaczoną w sposób opisany w pkt 54–55.

Zmienne zależne

50. Celem badania jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na wzrost wegetatywny *Lemna*. Niniejsza metoda badawcza opisuje dwie zmienne zależne, gdyż różne jurysdykcje mają różne preferencje i potrzeby regulacyjne. Aby wyniki badania były akceptowalne we wszystkich jurysdykcjach, wpływ należy ocenić przy użyciu obydwu zmiennych zależnych a) i b) opisanych poniżej.

a) *średnia właściwa szybkość wzrostu:* tę zmienną zależną oblicza się na podstawie zmian logarytmów liczb liści, a także na podstawie zmian logarytmów innego parametru pomiarowego (całkowitej powierzchni liści, suchej masy lub mokrej masy) w czasie (wyrażonych na dzień) w grupach kontrolnych i w każdej grupie badanej. Niekiedy określa się je mianem względnej szybkości wzrostu (12);

b) *przyrost:* tę zmienną zależną oblicza się na podstawie zmian liczby liści, a także na podstawie zmian innego parametru pomiarowego (całkowitej powierzchni liści, suchej masy lub mokrej masy) w grupach kontrolnych i w każdej grupie badanej, do końca badania.

51. Należy zauważyć, że wartości toksyczności obliczone przy użyciu tych dwóch zmiennych zależnych nie są porównywalne i różnicę tę należy uwzględnić przy wykorzystywaniu wyników badania. Jeżeli spełnione są warunki badania określone w niniejszej metodzie badawczej, wartości EC_x oparte na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_rC_x) będą zwykle wyższe od wyników opartych na przyroście (E_yC_x) ze względu na podstawę matematyczną tych podejść. Nie należy interpretować tego jako różnicy wrażliwości pomiędzy tymi dwiema zmiennymi zależnymi, lecz jedynie jako stwierdzenie, że wartości te są różne pod względem matematycznym. Pojęcie średniej właściwej szybkości wzrostu opiera się na ogólnym przebiegu wzrostu wykładniczego rzęsy w nieograniczonych kulturach, gdzie toksyczność szacuje się na podstawie wpływu na szybkość wzrostu, przy czym nie jest ona zależna od bezwzględnego poziomu właściwej szybkości wzrostu grupy kontrolnej, nachylenia krzywej stężenie–odpowiedź ani czasu trwania badania. Natomiast wyniki oparte na zmiennej zależnej w postaci przyrostu są zależne od wszystkich tych pozostałych zmiennych. E_yC_x jest zależne od

▼M6

właściwej szybkości wzrostu gatunków rzęsy użytych w każdym badaniu oraz od maksymalnej właściwej szybkości wzrostu, która może być różna dla różnych gatunków, a nawet dla różnych klonów. Tej zmiennej zależnej nie powinno się używać do porównywania wrażliwości na substancje toksyczne pomiędzy gatunkami rzęsy ani nawet różnymi klonami. Choć z naukowego punktu widzenia preferuje się szacowanie toksyczności z wykorzystaniem średniej właściwej szybkości wzrostu, oszacowania toksyczności na podstawie przyrostu również objęto niniejszą metodą badawczą, aby uwzględnić obecne wymogi regulacyjne istniejące w niektórych krajach.

52. Oszacowania toksyczności powinny być oparte na liczbie liści oraz na jednej dodatkowej zmiennej pomiarowej (całkowitej powierzchni liści, suchej masie lub mokrej masie), ponieważ niektóre substancje chemiczne mogą mieć znacznie większy wpływ na inne zmienne pomiarowe niż na liczbę liści. Wpływ ten nie zostałby wykryty w wyniku obliczenia tylko liczby liści.

53. Liczbę liści, jak również każdą inną rejestrowaną zmienną pomiarową, tj. całkowitą powierzchnię liści, suchą masę lub mokrą masę, zapisuje się w postaci tabelarycznej wraz ze stężeniami badanej substancji chemicznej podczas każdego pomiaru. Późniejsza analiza danych, np. w celu oszacowania LOEC, NOEC lub EC_x, powinna być oparta na wartościach dla poszczególnych kontrprób, a nie na obliczonych średnich dla każdej grupy badanej.

Średnia właściwa szybkość wzrostu

54. Średnią właściwą szybkość wzrostu dla konkretnego okresu oblicza się jako logarytmiczny przyrost zmiennych wzrostu – liczby liści oraz jednej innej zmiennej pomiarowej (całkowitej powierzchni liści, suchej masy lub mokrej masy) – przy użyciu poniższego wzoru, dla każdej kontrpróby kontrolnej i dla każdego zabiegu:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

gdzie:

— m_{i-j}: średnia właściwa szybkość wzrostu od momentu i do j,

— N_i: zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie i,

— N_j: zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie j,

— t: okres od czasu i do j.

Dla każdej grupy badanej i kontrolnej należy obliczyć średnią wartość szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji.

55. Średnią właściwą szybkość wzrostu należy obliczyć dla całego okresu badania (czas „i" w powyższym równaniu jest początkiem badania, a czas „j" jest końcem badania). Dla każdego stężenia testowego i grupy kontrolnej należy obliczyć średnią wartość średniej właściwej szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji. Ponadto należy ocenić szybkość wzrostu dla poszczególnych odcinków, aby określić wpływ badanej substancji chemicznej występujący w okresie narażenia (np. przez badanie krzywych wzrostu przekształconych na postać logarytmiczną). Znaczące różnice pomiędzy szybkością wzrostu dla poszczególnych odcinków a średnia szybkością wzrostu świadczą o odchyleniu od stałego wzrostu wykładniczego i uzasadniają dokładne zbadanie krzywych wzrostu. W takim przypadku zachowawczym podejściem byłoby porównanie właściwej szybkości wzrostu uzyskanej z kultur objętych badaniem w okresie maksymalnego zahamowania z właściwą szybkością wzrostu dla kultur kontrolnych w tym samym okresie.

56. Następnie można obliczyć procentowe zahamowanie tempa wzrostu (I_r) dla każdego badanego stężenia (grupy badanej) zgodnie z poniższym wzorem:

▼M6

$$\% I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

gdzie:

— % I_r: procentowe zahamowanie średniej właściwej szybkości wzrostu;

— μ_C: średnia wartość mw grupie kontrolnej,

— μ_T: średnia wartość m w grupie badanej.

Przyrost

57. Wpływ na przyrost określa się na podstawie dwóch zmiennych pomiarowych: liczby liści oraz jednej innej zmiennej pomiarowej (całkowitej powierzchni liści, suchej masy lub mokrej masy) zmierzonych w każdym naczyniu badawczym na początku i na końcu badania. Dla suchej masy lub mokrej masy początkową biomasę określa się na podstawie próbki liści pobranej z tej samej partii użytej do zaszczepienia naczyń badawczych (zob. pkt 20). Dla każdego badanego stężenia i próby kontrolnej należy obliczyć średnią wartość przyrostu wraz z oszacowaniami wariancji. Średnie procentowe zahamowanie przyrostu (% I_y) można obliczyć dla każdej grupy badanej w następujący sposób:

$$\% I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

gdzie:

— % I_y: procentowe zmniejszenie przyrostu,

— b_C: biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy kontrolnej,

— b_T: biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy badanej.

Wykreślanie krzywych stężenie–odpowiedź

58. Należy wykreślić krzywe stężenie-odpowiedź wiążące średnie procentowe zahamowanie zmiennej zależnej (I_r lub I_y obliczone w sposób wskazany w pkt 56 lub 57) i logarytm stężenia badanej substancji chemicznej.

Oszacowanie EC_x

59. Oszacowania EC_x (np. EC_{50}) powinny być oparte zarówno na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_rC_x), jak i na przyroście (E_yC_x), z których każde powinno opierać się na liczbie liści oraz jednej dodatkowej zmiennej pomiarowej (całkowitej powierzchni liści, suchej masie lub mokrej masie). Wynika to stąd, że istnieją takie badane substancje chemiczne, które wywierają różny wpływ na liczbę liści i inne zmienne pomiarowe. Pożądanymi parametrami toksyczności są więc cztery wartości EC_x dla każdego obliczonego poziomu zahamowania x: E_rC_x (liczba liści); E_rC_x (całkowita powierzchnia liści, sucha masa lub mokra masa); E_yC_x (liczba liści); oraz E_yC_x (całkowita powierzchnia liści, sucha masa lub mokra masa).

Procedury statystyczne

60. Celem jest uzyskanie ilościowej zależności stężenie-odpowiedź za pomocą analizy regresji. Możliwe jest zastosowanie ważonej regresji liniowej po przeprowadzeniu transformacji linearyzującej danych odpowiedzi – na przykład do jednostek probit, logit albo Weibulla (13), lecz preferowane są procedury regresji nieliniowej, które lepiej sprawdzają się w przypadku nieuniknionych nieregularności danych i odchyleń od wyrównanych rozkładów. Przy zbliżaniu się do zerowego albo całkowitego zahamowania nieregularności takie mogą zostać powiększone przez transformację, zakłócając analizę (13). Należy zwrócić uwagę, że standardowe metody analizy przy użyciu transformat probit, logit albo Weibulla są przeznaczone do stosowania do danych binarnych (np. dotyczących śmiertelności lub przeżywalności) i muszą zostać zmodyfikowane, aby uwzględnić dane dotyczące szybkości

▼M6

wzrostu lub przyrostu. Szczegółowe procedury wyznaczania wartości EC_x na podstawie danych ciągłych można znaleźć w (14), (15) i (16).

61. Dla każdej zmiennej zależnej, która ma być analizowana, należy zastosować zależność stężenie-odpowiedź do obliczenia oszacowań punktowych wartości EC_x. W miarę możliwości dla każdego oszacowania należy określić granice ufności na poziomie 95 %. Zgodność danych odpowiedzi z modelem regresji należy ocenić graficznie lub statystycznie. Analizę regresji należy przeprowadzić z zastosowaniem odpowiedzi z poszczególnych kontrprób, a nie średnich z grup badanych.

62. Oszacowania wartości EC_{50} i granice ufności można również otrzymać przy użyciu interpolacji liniowej z zastosowaniem metody bootstrap (17), jeżeli dostępne modele/metody regresji są nieodpowiednie do danych.

63. W celu oszacowania LOEC, a następnie NOEC, konieczne jest porównanie średnich z grup badanych przy użyciu technik analizy wariancji (ANOVA). Średnią dla każdego stężenia należy następnie porównać ze średnią kontrolną przy użyciu odpowiedniej metody wielokrotnego porównania lub testu trendu. Przydatny może być test Dunnetta lub Williamsa (18)(19)(20)(21). Należy ocenić, czy przyjęte w ANOVA założenie jednorodności wariancji nadal obowiązuje. Ocenę tę można przeprowadzić graficznie albo za pomocą formalnego testu (22). Odpowiednimi do tego celu testami są testy Levene'a lub Bartletta. Niespełnienie założenia o jednorodności wariancji można niekiedy skorygować za pomocą transformacji logarytmicznej danych. Jeżeli niejednorodność wariancji jest ekstremalna i nie można jej skorygować przez transformację, należy rozważyć analizę za pomocą takich metod jak regresyjne testy Jonckheere'a. Dodatkowe wskazówki dotyczące wyznaczania NOEC można znaleźć w (16).

64. W wyniku najnowszych osiągnięć naukowych zaleca się odstąpienie od stosowania pojęcia NOEC i zastąpienie go opartymi o regresję oszacowaniami punktowymi wartości EC_x. Dla niniejszego badania *Lemna* nie ustalono odpowiedniej wartości x. Wydaje się jednak, że odpowiedni jest przedział 10–20 % (w zależności od wybranej zmiennej zależnej), a najlepiej jest podać zarówno EC_{10}, jak i EC_{20}.

Sprawozdawczość

65. Sprawozdanie z badania musi zawierać poniższe informacje.

Badana substancja chemiczna:

— właściwości fizyczne i właściwości fizykochemiczne, w tym graniczna rozpuszczalność w wodzie,

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej (np. numer CAS), w tym czystość (zanieczyszczenia).

Badany gatunek:

— nazwa systematyczna, klon (jeśli jest znany) oraz źródło.

Warunki badania:

— zastosowana procedura badawcza (statyczna, półstatyczna lub przepływowa);

— data rozpoczęcia badania i czas jego trwania;

— pożywka;

— opis projektu doświadczenia: naczynia badawcze i przykrywki, objętości roztworów, liczba kolonii i liści przypadających na naczynie badawcze na początku badania;

— stężenia testowe (nominalne i zmierzone, gdy jest to stosowne) oraz liczba kontrprób na stężenie;

▼**M6**

— metody przygotowywania roztworów podstawowych i roztworów do badań, w tym ewentualne zastosowanie rozpuszczalników lub środków dyspergujących;

— temperatura podczas badania;

— źródło światła, natężenie i jednorodność światła;

— wartości pH pożywki testowej i kontrolnej;

— stężenia badanej substancji chemicznej oraz metoda analizy wraz z odpowiednimi danymi oceny jakości (badania walidacyjne, odchylenia standardowe lub granice ufności analiz);

— metody określania liczby liści i innych zmiennych pomiarowych, np. suchej masy, mokrej masy lub powierzchni liści;

— wszelkie odstępstwa od niniejszej metody badawczej.

Wyniki:

— dane surowe: liczba liści oraz inne zmienne pomiarowe w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym podczas każdej obserwacji i analizy;

— średnie i odchylenia standardowe dla każdej zmiennej pomiarowej;

— krzywe wzrostu dla każdego stężenia (zalecane ze zmienną pomiarową przekształconą do postaci logarytmicznej, zob. pkt 55);

— czas podwojenia/szybkość wzrostu w grupie kontrolnej na podstawie liczby liści;

— obliczone zmienne zależne dla każdej kontrpróby poddanej zabiegowi wraz z wartościami średnimi i współczynnikiem zmienności dla kontrprób;

— graficzne przedstawienie zależności stężenie/skutek;

— oszacowania toksykologicznych punktów końcowych dla zmiennych zależnych, np. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, oraz związane z nimi przedziały ufności. LOEC lub NOEC, jeżeli zostały obliczone, oraz metody statystyczne użyte do ich wyznaczenia;

— jeżeli zastosowano ANOVA – wielkość wpływu, który można wykryć (np. najmniejsza znacząca różnica);

— wszelka stymulacja wzrostu stwierdzona w którymkolwiek zabiegu;

— wszelkie wizualne oznaki fitotoksyczności, jak również obserwacje roztworów do badań;

— omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

(1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (ponownie zatwierdzony w 1998 r.), s. 733–742. W: Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(2) US EPA – Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (1996). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8 s.

(3) AFNOR – Association Française de Normalisation (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 s.

(4) SSI – Szwedzki Instytut Normalizacyjny. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 s. (w języku szwedzkim).

▼**M6**

(5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37–120 s.

(6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Seria raportów technicznych nr 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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 23. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż.

(9) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (ISO). 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. Raport Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych nr EPA-600/3-77 108. Wrzesień 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*. TER SOP (grudzień 2008),/HT>: 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. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż.

(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

Dodatek 1

Definicje

Do celów niniejszej metody badawczej użyto następujących definicji i skrótów.

Biomasa jest to sucha masa materii żywej obecnej w populacji. W niniejszym badaniu zwykle mierzy się surogaty biomasy, takie jak liczba lub powierzchnia liści, w związku z czym określenie „biomasa" odnosi się także do tych pomiarów zastępczych.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Chloroza jest to żółknięcie tkanki liści.

Klon jest to organizm lub komórka powstałe z pojedynczego osobnika przez rozmnażanie wegetatywne. Osobniki z tego samego klonu są zatem genetycznie identyczne.

Kolonia oznacza skupisko macierzystych lub pochodnych liści (zwykle 2 do 4) przyczepionych do siebie nawzajem. Niekiedy określana jest mianem rośliny.

$\mathbf{EC_x}$ jest stężeniem badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w pożywce, powodującym zmniejszenie wzrostu *Lemna* o x % (np. 50 %) w danym okresie narażenia (który należy wyraźnie określić, jeśli odbiega od pełnego lub normalnego czasu trwania badania). Aby jednoznacznie oznaczyć wartość EC wynikającą z szybkości wzrostu albo z przyrostu, w odniesieniu do szybkości wzrostu używa się symbolu „E_rC", a w odniesieniu do przyrostu – symbolu „E_yC", po którym następuje użyta zmienna pomiarowa, np. E_rC (liczba liści).

Badanie przepływowe jest to badanie, w którym roztwory do badań są wymieniane w sposób ciągły.

Liść jest to indywidualna/pojedyncza „liściopodobna" struktura rośliny rzęsy wodnej. Jest to najmniejsza jednostka, tj. osobnik, zdolna do rozmnażania się.

Garbatość oznacza liście o wybrzuszonym lub spuchniętym wyglądzie.

Wzrost jest to przyrost zmiennej pomiarowej, np. liczby liści, suchej masy, mokrej masy lub powierzchni liści, w trakcie okresu badania.

Szybkość wzrostu (średnia właściwa szybkość wzrostu) jest to logarytmiczny przyrost biomasy w okresie narażenia.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC) jest to najniższe badane stężenie, przy którym obserwuje się, że substancja chemiczna ma statystycznie istotny wpływ na ograniczenie wzrostu (przy $p < 0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną w danym czasie narażenia. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC muszą mieć szkodliwy skutek równy lub większy niż te, które są obserwowane przy LOEC. W przypadku gdy te dwa warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC).

Zmienne pomiarowe są to dowolnego typu zmienne, które mierzy się, aby wyrazić punkt końcowy badania przy użyciu jednej zmiennej zależnej lub większej ich liczby. W niniejszej metodzie zmiennymi pomiarowymi są liczba liści, powierzchnia liści, sucha masa i mokra masa.

Monokultura jest to kultura obejmująca jeden gatunek roślin.

Martwica jest to obumarła (tj. biała lub nasiąknięta wodą) tkanka liściowa.

Stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) jest to badane stężenie bezpośrednio poniżej LOEC.

Fenotyp są to obserwowalne cechy organizmu zdeterminowane przez oddziaływanie między jego genami a środowiskiem.

Zmienne zależne są to zmienne służące do szacowania toksyczności, uzyskane z dowolnych zmierzonych zmiennych opisujących biomasę za pomocą różnych metod obliczeniowych. W przypadku niniejszej metody badawczej zmiennymi zależnymi są szybkość wzrostu i przyrost, które otrzymuje się ze zmiennych pomiarowych, takich jak liczba liści, powierzchnia liści, sucha masa lub mokra masa.

▼M6

Badanie półstatyczne (z wymianą) jest to badanie, w którym roztwór do badań jest okresowo wymieniany w określonych odstępach czasu w trakcie badania.

Badanie statyczne jest to metoda badawcza bez wymiany roztworu do badań w trakcie badania.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Punkt końcowy badania opisuje ogólny czynnik, który będzie ulegał zmianie pod wpływem badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną, co jest celem badania. W niniejszej metodzie badawczej punktem końcowym badania jest zahamowanie wzrostu, które można wyrazić za pomocą różnych zmiennych zależnych opartych na jednej zmiennej pomiarowej lub większej ich liczbie.

Pożywka jest to kompletne syntetyczne podłoże, na którym rośliny wzrastają, gdy są narażone na działanie badanej substancji chemicznej. Badana substancja chemiczna jest zwykle rozpuszczona w pożywce.

Przyrost jest to wartość zmiennej pomiarowej wyrażająca biomasę na końcu okresu narażenia minus wartość zmiennej pomiarowej na początku okresu narażenia.

▼M6

Dodatek 2

Opis gatunków *Lemna*

Roślina wodna powszechnie zwana rzęsą, obejmująca gatunki *Lemna*, należy do rodziny *Lemnaceae*, na którą składa się szereg występujących na całym świecie gatunków w czterech rodzajach. Ich różny wygląd i taksonomia zostały wyczerpująco opisane (1)(2). *Lemna gibba* i *L. minor* są gatunkami reprezentatywnymi dla obszarów o klimacie umiarkowanym i są powszechnie używane do badań toksyczności. Obydwa gatunki mają pływającą lub zanurzoną tarczowatą łodygę (liść) i bardzo cienkie wypustki korzenia wychodzące ze środka dolnej powierzchni każdego liścia. Gatunki *Lemna* rzadko wytwarzają kwiaty i rośliny rozmnażają się wegetatywnie poprzez wytwarzanie nowych liści (3). W porównaniu do starszych roślin młode rośliny bywają zazwyczaj bledsze, mają krótsze korzenie i składają się z dwóch do trzech liści o różnych rozmiarach. Mały rozmiar gatunku *Lemna*, jego prosta budowa, wegetatywne rozmnażanie się oraz krótki czas trwania pokolenia sprawiają, że rośliny tego rodzaju są bardzo dogodnym obiektem badań laboratoryjnych (4)(5).

Z powodu prawdopodobnej zmienności międzygatunkowej pod względem wrażliwości miarodajne są jedynie porównania wrażliwości w obrębie gatunku.

Przykłady gatunków *Lemna*, które były używane do badań: literatura przedmiotu dotycząca gatunków

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. Wydział Ekologii Systemów, Uniwersytet w Sztokholmie.

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: Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8 s.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 s.

Szwedzki Instytut Normalizacyjny (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor* , duckweed. SS 02 82 13. 15 s. (w języku szwedzkim).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (ponownie zatwierdzony w 1998 r.), s. 733–742.

Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8 s.

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. i in. (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., TER SOP (grudzień 2008),/HT>:2102–2111.

Źródła gatunków *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Kanada, 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
Stany Zjednoczone
tel. 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SZWECJA
tel: +46 8 674 7240
faks: +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Niemcy
e-mail: lemna@uba.de

BIBLIOGRAFIA

(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*). Tom 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zurych, Szwajcaria.

(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, Uniwersytet w 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**

Dodatek 3

Utrzymanie kultury wyjściowej

Kultury wyjściowe mogą być utrzymywane w niskich temperaturach (4–10 °C) przez dłuższy okres bez konieczności odtwarzania. Pożywka dla gatunku *Lemna* może być taka sama jak używana do badań, lecz do kultur wyjściowych można używać innych pożywek bogatych w składniki odżywcze.

Okresowo pewną liczbę młodych, jasnozielonych roślin przenosi się do zawierających świeżą pożywkę naczyń przeznaczonych na nowe kultury, stosując technikę aseptyczną. W proponowanych tu chłodniejszych warunkach wydzieloną hodowlę pochodną można prowadzić w odstępach czasu wynoszących do trzech miesięcy.

Należy używać chemicznie czystych (przepłukanych kwasem) i sterylnych naczyń na nowe kultury oraz stosować techniki aseptyczne. W razie zanieczyszczenia kultury wyjściowej, np. glonami lub grzybami, należy podjąć działania w celu wyeliminowania zanieczyszczających organizmów. W przypadku glonów i większości innych zanieczyszczających organizmów można tego dokonać przez powierzchniową sterylizację. Pobiera się próbkę zanieczyszczonego materiału roślinnego i odcina się korzenie. Następnie materiał energicznie wytrząsa się w czystej wodzie, po czym zanurza się w 0,5-procentowym (obj.) roztworze podchlorynu sodu na czas od 30 sekund do 5 minut. Materiał roślinny następnie płucze się sterylną wodą i przenosi się, w partiach, do przeznaczonych na kultury naczyń zawierających świeżą pożywkę. Wiele liści obumrze w wyniku tego zabiegu, zwłaszcza jeśli stosowane będą dłuższe okresy narażenia, lecz niektóre spośród tych, które przeżyją, będą zazwyczaj wolne od zanieczyszczenia. Liści tych można następnie użyć do ponownego zaszczepienia nowych kultur.

▼M6

Dodatek 4

Pożywki

Dla *L. minor* i *L. gibba* zalecane są różne pożywki. Dla *L. minor* zaleca się zmodyfikowaną pożywkę według normy szwedzkiej (SIS), natomiast dla *L. gibba* zalecana jest pożywka 20X AAP. Skład obydwu pożywek podano poniżej. Do przygotowania tych pożywek należy użyć odczynników lub substancji chemicznych do analiz oraz wody dejonizowanej.

Pożywka dla *Lemna* według normy szwedzkiej (SIS)

— Roztwory podstawowe I–V sterylizuje się przez obróbkę w autoklawie (120 °C, 15 min.) lub za pomocą filtracji przez przeponę (o wielkości porów około 0,2 mm).

— Roztwór podstawowy VI (i opcjonalnie VII) sterylizuje się wyłącznie przez filtrację przeponową; roztworów tych nie należy obrabiać w autoklawie.

— Sterylne roztwory podstawowe należy przechowywać w warunkach chłodnych i ciemnych. Roztwory podstawowe I–V należy usunąć po sześciu miesiącach, natomiast roztwory podstawowe VI (i opcjonalnie VII) mają dopuszczalny okres przechowywania wynoszący jeden miesiąc.

Nr roztworu podstawowego	Substancja	Stężenie w roztworze podstawowym (g/l)	Stężenie w przygotowanej pożywce (mg/ · l)	Przygotowana pożywka	
				Pierwiastek	Stężenie w przygotowanej pożywce (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 (bufor)	490	490	—	—

Aby przygotować jeden litr pożywki SIS, do 900 ml wody dejonizowanej dodaje się:

▼M6

— 10 ml roztworu podstawowego I,

— 5 ml roztworu podstawowego II,

— 5 ml roztworu podstawowego III,

— 5 ml roztworu podstawowego IV,

— 1 ml roztworu podstawowego V,

— 5 ml roztworu podstawowego VI,

— 1 ml roztworu podstawowego VII (opcjonalnie).*Uwaga:* Dla niektórych badanych substancji chemicznych może być potrzebny dodatkowy roztwór podstawowy VII (bufor MOPS) (zob. pkt 11).

pH reguluje się do 6,5 ± 0,2 przy użyciu 0,1- lub 1-molowego HCl albo NaOH, a objętość uzupełnia się do jednego litra, używając wody dejonizowanej.

Pożywka 20X AAP

Roztwory podstawowe przygotowuje się w sterylnej wodzie destylowanej lub dejonizowanej.

Sterylne roztwory podstawowe należy przechowywać w warunkach chłodnych i ciemnych. W takich warunkach dopuszczalny okres przechowywania roztworów podstawowych wynosić będzie co najmniej 6–8 tygodni.

Dla pożywki 20X AAP przygotowuje się pięć roztworów podstawowych składników odżywczych (A1, A2, A3, B i C), używając substancji chemicznych o czystości odczynnikowej. 20 ml każdego roztworu podstawowego składników odżywczych dodaje się do około 850 ml wody dejonizowanej, tworząc pożywkę. pH reguluje się do 7,5 ± 0,1 przy użyciu 0,1- lub 1-molowego HCl albo NaOH, a objętość uzupełnia się do jednego litra, używając wody dejonizowanej. Pożywkę następnie przefiltrowuje się przez filtr przeponowy (około) 0,2 mm do sterylnego pojemnika.

Pożywkę przeznaczoną do badań należy przygotować 1–2 dni przed użyciem, aby pH mogło się ustabilizować. Przed użyciem należy sprawdzić i w razie potrzeby wyregulować pH pożywki przez dodanie 0,1- lub 1-molowego NaOH albo HCl, jak opisano powyżej.

Nr roztworu podstawowego	Substancja	Stężenie w roztworze podstawowym (g/ · l) (*)	Stężenie w przygotowanej pożywce (mg/ · l) (*)	Przygotowana pożywka	
				Pierwiastek	Stężenie (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	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2 \cdot O$	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**

Nr roztworu podstawowego	Substancja	Stężenie w roztworze podstawowym (g/ · l) (*)	Stężenie w przygotowanej pożywce (mg/ · l) (*)	Przygotowana pożywka	
				Pierwiastek	Stężenie (mg/ · l) (*)
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 mg/l	Zn	31 mg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 mg/l	Co	7,1 mg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 mg/l	Mo	58 mg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 mg/l	Cu	0,080 mg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) O ile nie podano inaczej.

Uwaga: Teoretycznie odpowiednie końcowe stężenie wodorowęglanu (które pozwoli uniknąć znacznej regulacji pH) wynosi 15 mg/l, a nie 300 mg/l. Jednakże historyczne stosowanie odżywki 20X AAP, w tym w badaniu międzylaboratoryjnym dla niniejszej metody, oparte jest na stężeniu 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse i R. Lacey. (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.)

Pożywka STEINBERGA (za ISO 20079)

Stężenia i roztwory podstawowe

Zmodyfikowana pożywka Steinberga zastosowana jest w ISO 20079 dla samego *Lemna minor* (gdyż tylko *Lemna minor* jest tam dopuszczony), lecz próby wykazały, iż można uzyskiwać dobre wyniki również w przypadku *Lemna gibba*.

Do przygotowania pożywki należy użyć substancji chemicznych o czystości średniej, odczynnikowej lub do analizy oraz wody dejonizowanej.

Należy przygotować odżywkę z roztworów podstawowych lub 10-krotnie zatężonej odżywki, co pozwala na maksymalne stężenie odżywki bez strącenia.

Tabela 1

Pożywka STEINBERGA o stabilizowanym pH (zmodyfikowana wg Altenburgera)

Składnik		Pożywka	
Makroelementy	masa cząsteczkowa	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**

Składnik		Pożywka	
Mikroelementy	masa cząsteczkowa	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
Sól dwusodowa EDTA, dwuwodna	372,24	1 500,00	4,03

Tabela 2

Roztwory podstawowe (makroelementy)

1. Makroelementy (zatężone 50-krotnie)	**g/l**
Roztwór podstawowy 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Roztwór podstawowy 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Roztwór podstawowy 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabela 3

Roztwory podstawowe (mikroelementy)

2. Mikroelementy (zatężone 1 000-krotnie)	**mg/l**
Roztwór podstawowy 4:	
H_3BO_3	120,0
Roztwór podstawowy 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Roztwór podstawowy 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Roztwór podstawowy 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Roztwór podstawowy 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
Sól dwusodowa EDTA, dwuwodna	1 500,00

— Roztwory podstawowe 2 i 3 oraz oddzielnie 4–7 można połączyć z sobą (z uwzględnieniem wymaganych stężeń).

▼**M6**

— Aby zapewnić dłuższy okres trwałości roztworów podstawowych, należy poddać je obróbce w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 20 min lub, alternatywnie, przeprowadzić sterylną filtrację (0,2 μm). Dla roztworu podstawowego 8 zdecydowanie zaleca się sterylną filtrację (0,2 μm).

Przygotowanie pożywki STEINBERGA (zmodyfikowanej) o stężeniu końcowym

— Dodać 20 ml roztworów podstawowych 1, 2 i 3 (zob. tabela 2) do około 900 ml wody dejonizowanej, aby uniknąć strącenia.

— Dodać 1,0 ml roztworów podstawowych 4, 5, 6, 7 i 8 (zob. tabela 3).

— pH powinno wynosić 5,5 ± 0,2 (wyregulować przez dodanie ograniczonej do minimum objętości roztworu NaOH lub HCl).

— Uzupełnić wodą do 1 000 ml.

— Jeżeli roztwory podstawowe są wysterylizowane i użyto odpowiedniej wody, dalsza sterylizacja nie jest konieczna. Jeżeli sterylizacji dokonuje się na końcowej pożywce, to roztwór podstawowy 8 należy dodać po obróbce w autoklawie (w temperaturze 121 °C przez 20 min).

Przygotowanie 10-krotnie zatężonej pożywki STEINBERGA (zmodyfikowanej) do średnioterminowego przechowywania

— Dodać 20 ml roztworów podstawowych 1, 2 i 3 (zob. tabela 2) do około 30 ml wody, aby uniknąć strącenia.

— Dodać 1,0 ml roztworów podstawowych 4, 5, 6, 7 i 8 (zob. tabela 3). Uzupełnić wodą do 100 ml.

— Jeżeli roztwory podstawowe są wysterylizowane i użyto odpowiedniej wody, dalsza sterylizacja nie jest konieczna. Jeżeli sterylizacji dokonuje się na końcowej pożywce, to roztwór podstawowy 8 należy dodać po obróbce w autoklawie (w temperaturze 121 °C przez 20 min).

— pH pożywki (końcowe stężenie) powinno wynosić 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27. BADANIE TOKSYCZNOŚCI W UKŁADZIE OSAD-WODA NA OCHOTKOWATYCH Z WYKORZYSTANIEM WZBOGACONEGO OSADU

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna dotyczącej badań wytycznej OECD nr 218 (2004). Niniejszą metodę zaprojektowano, by ocenić skutki przedłużonego narażenia żyjących w osadach larw *Chironomus* sp., należących do rzędu słodkowodnych muchówek, na działanie chemikaliów. Metoda opiera się na protokołach badania toksyczności obowiązujących dla *Chironomus riparius* i *Chironomus tentans*, które opracowano w Europie (1) (2) (3) i Ameryce Płn. (4) (5) (6) (7) (8) i potwierdzono w badaniu międzylaboratoryjnym (1) (6) (9). Można także wykorzystywać inne dobrze udokumentowane gatunki ochotkowatych, np. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Scenariusz narażenia stosowany w tej metodzie badawczej polega na wzbogacaniu osadu substancją badaną. Wybór odpowiedniego scenariusza narażenia zależy od zamierzonego zastosowania badania. Scenariusz polegający na wzbogacaniu osadu ma na celu symulację utrzymywania się w osadzie podwyższonego stężenia chemikaliów. Ten układ narażenia obejmuje wzbogacanie osadu w układzie badawczym osad denny-woda.

3. Substancje, które należy przebadać pod kątem organizmów żyjących w osadach, zwykle pozostają w tym układzie przez długi czas. Organizmy żyjące w osadach mogą być narażane na działanie substancji kilkoma drogami. Względne znaczenie danej drogi narażenia i czas, jaki jest potrzebny, by przyczyniła się ona do ogólnych skutków toksycznych, zależy od fizykochemicznych właściwości danej substancji chemicznej. W przypadku substancji silnie adsorbujących (np. substancji o log K_{ow} > 5) lub w przypadku substancji tworzących wiązanie kowalencyjne z osadami, znaczącą drogą narażenia może być przyjmowanie zanieczyszczonego pokarmu. Aby zapobiec niedoszacowaniu toksyczności wysokolipofilowych substancji, można rozważyć zastosowanie pokarmu dodawanego do osadu przed wprowadzeniem substancji badanej. Aby uwzględnić wszelkie możliwe drogi narażenia, niniejsza metoda badawcza ukierunkowana jest na narażenie długoterminowe. Badanie trwa od 20 do 28 dni w przypadku *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a w przypadku *C. tentans* od 28 do 65 dni. Jeśli do określonego celu potrzebne są dane krótkoterminowe, na przykład w celu zbadania skutków działania substancji niestabilnych, po okresie dziesięciu dni można usunąć dodatkowe replikaty.

4. Mierzone punkty końcowe to całkowita liczba wylęgniętych dorosłych osobników i czas do wylęgu. Jeśli potrzebne są dodatkowe dane krótkoterminowe, zaleca się, by pomiarów przeżycia i wzrostu larw dokonywać po okresie dziesięciu dni, korzystając w stosownych przypadkach z dodatkowych replikatów.

5. Zalecane jest stosowanie osadów preparowanych. Osady preparowane są korzystniejsze od osadów naturalnych z kilku względów:

   — zmienność eksperymentalna jest ograniczona, ponieważ osad preparowany stanowi odtwarzalną „zestandaryzowaną matrycę", tak że wyeliminowana zostaje potrzeba znalezienia źródeł niezanieczyszczonego i czystego osadu,

   — badania można rozpocząć w każdej chwili, unikając zmienności sezonowej badanego osadu i nie jest konieczna wstępna obróbka osadu w celu usunięcia rodzimej fauny; stosowanie osadu preparowanego zmniejsza także koszty związane ze zbieraniem w terenie dostatecznych ilości osadu na potrzeby rutynowych badań,

   — zastosowanie osadu preparowanego umożliwia porównanie toksyczności i stosowną klasyfikację substancji.

6. Definicje są zamieszczone w dodatku 1.

▼M4

ZASADA METODY BADANIA

7. Larwy ochotkowatych w pierwszym stadium larwalnym poddawane są działaniu badanej substancji chemicznej o różnym stopniu stężenia w układach osad denny-woda. Osad wzbogaca się badaną substancją chemiczną, a następnie larwy w pierwszym stadium larwalnym wprowadza się do zlewek, w których ustabilizowano stężenia badanej substancji w osadzie i wodzie. Na końcu badania mierzy się współczynnik wylęgu i rozwoju ochotkowatych. W miarę potrzeby przeżycie i masa larw mogą być także mierzone po 10 dniach (z wykorzystaniem w stosownych przypadkach dodatkowych replikatów). Dane te analizowane są przy użyciu modelu regresyjnego w celu oszacowania stężenia, które spowodowałoby zmniejszenie wylęgu, przeżycia lub wzrostu larw o x % (np.EC_{15}, EC_{50} itd.) albo przez badanie hipotezy statystycznej w celu określenia stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) lub najniższego stężenia, przy którym obserwuje się szkodliwe zmiany (LOEC). To ostatnie wymaga porównania wartości zmian z wartościami kontrolnymi z użyciem badań statystycznych.

INFORMACJE NA TEMAT SUBSTANCJI BADANEJ

8. Należy znać rozpuszczalność substancji badanej w wodzie, prężność par, podział substancji w osadzie oraz jej stabilność w wodzie i osadzie, uzyskane w wyniku pomiarów lub obliczeń. Powinna być dostępna wiarygodna metoda analityczna do oznaczania ilościowego substancji badanej w osadzie, wodzie porowej i warstwie wody powyżej osadu ze znaną i udokumentowaną dokładnością oraz granicą wykrywalności. Użyteczne informacje obejmują wzór strukturalny i czystość substancji badanej. Do przydatnych informacji należą także dane dotyczące chemicznych losów substancji w środowisku (np. jej rozpraszanie, rozkład abiotyczny i biotyczny itd.). Dalsze wskazówki dotyczące badania substancji o własnościach fizykochemicznych utrudniających ich badanie podano w pozycji (12) w bibliografii.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

9. Substancje odniesienia mogą być okresowo badane dla zagwarantowania, że protokół i warunki badania są rzetelne. Przykłady substancji toksycznych stosowanych z powodzeniem w badaniach międzylaboratoryjnych i walidacyjnych: lindan, trifluralina, pentachlorofenol, chlorek kadmu i chlorek potasu (1) (2) (5) (6) (13).

WAŻNOŚĆ BADANIA

10. Aby badanie było ważne, obowiązują następujące warunki:

— odsetek wylęgniętych osobników dorosłych w próbach kontrolnych musi na końcu badania być co najmniej na poziomie 70 % (1) (6),

— w naczyniach zawierających próby kontrolne wylęg osobników dorosłych *C. riparius* i *C. yoshimatsui* z larw powinien nastąpić między 12. a 23. dniem od ich wprowadzenia do naczynia; w przypadku *C. tentans* niezbędny jest okres od 20 do 65 dni,

— na końcu badania należy zmierzyć wartość pH oraz stężenie rozpuszczonego tlenu w każdym naczyniu. Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 60 procent wartości nasycenia powietrzem (ASV) w wybranej temperaturze, a wartość pH w warstwie wody powyżej osadu powinna we wszystkich naczyniach używanych do badania znajdować się w przedziale 6–9,

— temperatura wody nie powinna różnić się o więcej niż ± 1,0 °C. Temperaturę wody można kontrolować przy użyciu pomieszczenia izotermicznego i w takim przypadku temperatura pomieszczenia powinna być potwierdzana w stosownych odstępach czasowych.

▼M4

OPIS METODY

Naczynia używane do badania

11. Badanie prowadzone jest w szklanych zlewkach o pojemności 600 ml i średnicy 8 cm. Inne naczynia także mogą nadawać się do badania, powinny jednak zapewniać odpowiednią głębokość warstwy osadu i warstwy wody powyżej. Powierzchnia osadu powinna być wystarczająca, by zapewnić od 2 do 3 cm^2 na larwę. Stosunek głębokości warstwy osadu do warstwy wody powyżej powinien wynosić 1:4. Naczynia do badania i inne przyrządy mające kontakt z układem badawczym powinny być w całości wykonane ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału (np. teflonu).

Wybór gatunków

12. Gatunkiem wykorzystywanym w badaniu powinien być w miarę możliwości *Chironomus riparius*. Odpowiedni jest także *Chironomus tentans*, ale jest trudniejszy w hodowli i wymaga dłuższego okresu badania. Można także korzystać z *Chironomus yohimatsui*. Szczegóły metod hodowli dla *Chironomus riparius* podano w dodatku 2. Informacje dotyczące warunków hodowli są także dostępne dla innych gatunków, tj. *Chironomus tentans* (4) i *Chironomus yoshimatsui* (11). Przed przeprowadzeniem badania należy potwierdzić identyfikację gatunków, ale nie jest to wymagane przed każdym badaniem, jeśli organizmy pochodzą z hodowli wewnątrzlaboratoryjnej.

Osad

13. W miarę możliwości należy stosować osad preparowany (zwany także osadem regenerowanym, sztucznym lub syntetycznym). Jeśli jednak korzysta się z osadu naturalnego, należy go scharakteryzować (co najmniej pod kątem pH, zawartości węgla organicznego, zaleca się także określenie innych parametrów, takich jak stosunek C/N i granulometria). Osad taki powinien być wolny od zanieczyszczeń i innych organizmów, które mogłyby konkurować z ochotkowatymi lub je zjadać. Zaleca się także, by przed jego wykorzystaniem w badaniu toksyczności dla ochotkowatych naturalny osad był przez siedem dni kondycjonowany w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania. Do wykorzystania w tym badaniu (1) (15) (16) zaleca się następujący osad preparowany oparty na sztucznej glebie stosowanej w metodzie badawczej C.8 (14):

a) torf 4–5 % (w przeliczeniu na suchą masę): wartość pH możliwie najbardziej zbliżona do przedziału 5,5 do 6,0; ważne jest, by stosować torf w postaci sproszkowanej, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 1 mm) i suszony wyłącznie powietrzem;

b) glinka kaolinowa 20 % (w przeliczeniu na suchą masę) (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);

c) piasek kwarcowy 75–76 % (w przeliczeniu na suchą masę) (powinien przeważać drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek mierzy od 50 do 200 μm);

d) dla uzyskania wilgotności końcowej mieszkanki na poziomie od 30–50 % dodaje się wodę dejonizowaną;

e) w celu skorygowania pH końcowej mieszaniny osadu do wartości 7,0 ± 0,5 dodaje się do niej chemicznie czysty węglan wapnia ($CaCO_3$). Zawartość węgla organicznego w końcowej mieszaninie powinna wynosić 2 % (± 0,5 %) i należy ją skorygować przy użyciu odpowiednich ilości torfu i piasku, zgodnie z lit. a) i c).

14. Źródło torfu, glinki kaolinowej i piasku powinno być znane. Składniki osadu należy sprawdzić pod kątem zanieczyszczenia chemicznego (np. metalami ciężkimi, związkami chloroorganicznymi, związkami fosforoorganicznymi itp.). W dodatku 3 podano przykładowy sposób przygotowania osadu preparowanego. Dopuszczalne jest także mieszanie suchych składników, o ile wykaże się, że po dodaniu warstwy wody powyżej osadu składniki osadu się nie rozdzielają (np. nie unoszą się cząstki torfu) oraz że torf lub osad jest poddawany dostatecznemu kondycjonowaniu.

▼M4

Woda

15. Jako wodę do badania można stosować każdy rodzaj wody, której charakterystyka zgodna jest z charakterystyką chemiczną wody nadającej się do rozcieńczania, jak opisano w dodatkach 2 i 4. Do hodowli ochotkowatych i do badania może służyć każdy odpowiedni rodzaj wody, np. woda naturalna (powierzchniowa lub gruntowa), woda regenerowana (zob. dodatek 2) lub odchlorowana woda wodociągowa, pod warunkiem że ochotkowate przeżyją w niej przez okres hodowli i badania bez wykazywania oznak stresu. Na początku badania wartość pH wody do badania powinna wynosić od 6 do 9, a twardość ogółem wody wyrażona w zawartości $CaCO_3$ nie powinna być wyższa niż 400 mg/l. Jeśli jednak podejrzewa się, że między jonami powodującymi twardość wody a substancją badaną dochodzi do interakcji, powinna być stosowana woda o mniejszej twardości (a zatem w takim przypadku nie wolno używać pożywki Elendta M4). Przez okres całego badania należy stosować ten sam rodzaj wody. Cechy jakości wody, wymienione w dodatku 4, należy mierzyć co najmniej dwa razy w roku lub ilekroć zachodzi podejrzenie, że mogły one ulec znacznej zmianie.

Roztwory podstawowe – osady wzbogacane

16. Wzbogacone osady o wybranym stężeniu substancji badanej są zwykle przygotowywane przez dodanie roztworu tej substancji bezpośrednio do osadu. Roztwór podstawowy substancji badanej rozpuszczonej w dejonizowanej wodzie miesza się z osadem gotowym z użyciem walcarki, mieszalnika lub ręcznie. Jeżeli substancja badana słabo rozpuszcza się w wodzie, można ją rozpuścić w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym, w możliwie jak najmniejszej jego ilości (np. w heksanie, acetonie lub chloroformie). Roztwór taki następnie miesza się z drobnym piaskiem kwarcowym, w ilości 10 gramów na jedno naczynie. Rozpuszczalnikowi należy pozwolić wyparować i całkowicie zniknąć z piasku; piasek następnie miesza się z osadem w określonej ilości na każdą zlewkę. Do rozpuszczenia, rozrzedzenia lub zemulsyfikowania substancji badanej mogą być użyte jedynie łatwo ulatniające się czynniki. Należy mieć na uwadze, że przy preparowaniu osadu należy uwzględniać piasek zawarty w mieszance substancji badanej z piaskiem (czyli osad należy przygotować z mniejszej ilości piasku). Należy dopilnować, by substancja badana dodana do osadu została w nim starannie i równo rozprowadzona. W razie konieczności dla określenia jednorodności mieszanki należy zanalizować podpróbki.

PROJEKT BADANIA

17. Projekt badania obejmuje dobór liczby badanych stężeń i ich zróżnicowanie, liczby naczyń zawierających dane stężenie substancji i liczby larw na jedno naczynie. Opisano projekty dotyczące punktowego oszacowania wartości EC, oszacowania wartości NOEC i przeprowadzenia badania granicznego.

Projekt analizy regresyjnej

18. Stężenie powodujące zmiany (np. EC_{15}, EC_{50}) i zakres stężeń, powyżej którego skutki działania substancji badanej stają się przedmiotem zainteresowania, należy wyskalować z zastosowaniem stężeń ujętych w badaniu. Ogólnie, dokładność, a w szczególności ważność naukowa, z jaką można oszacować stężenia powodujące zmiany (EC_x), poprawia się, gdy stężenie powodujące zmiany wchodzi w zakres badanych stężeń. Należy unikać ekstrapolowania wyników znacznie poniżej najniższego stężenia dającego wynik dodatni lub powyżej najwyższego stężenia. Wstępne badanie ustalające zakres jest pomocne przy wyborze zakresu stężeń do zastosowania (zob. pkt 27).

▼M4

19. Jeśli trzeba oszacować EC_x, należy zbadać co najmniej pięć stężeń i trzy replikaty dla każdego stężenia. W każdym przypadku zaleca się stosowanie dostatecznych stężeń substancji badanej, aby umożliwić dobre oszacowanie parametrów modelu. Współczynnik odstępów między stężeniami nie powinien być większy niż dwa (z wyjątkiem przypadków, gdy krzywa dawka-odpowiedź ma łagodny przebieg). Liczba replikatów przy każdym podaniu dawki substancji badanej może być zmniejszona, jeśli zwiększy się liczbę stężeń substancji badanej dających różne odpowiedzi. Zwiększenie liczby replikatów lub zmniejszenie wielkości odstępów między badanymi stężeniami zwykle prowadzi do zwężenia przedziałów ufności dla danego badania. Jeśli celem jest oszacowanie przeżycia i wzrostu larw w okresie 10 dni, wymagane są dodatkowe replikaty.

Projekt dotyczący oszacowania NOEC/LOEC

20. Jeśli celem jest oszacowanie wartości LOEC lub NOEC, należy zastosować pięć stężeń substancji badanej z co najmniej czterema replikatami, a współczynnik odstępów między stężeniami nie powinien być większy niż dwa. Liczba replikatów powinna być na tyle duża, by zapewnić odpowiednią moc statystyczną dla wykrycia 20 % różnicy z próbą kontrolną przy istotności wynoszącej 5 % (p = 0,05). W przypadku współczynnika rozwoju zwykle stosowna jest analiza wariancji (ANOVA), np. badanie Dunnetta i badanie Williamsa (17) (18) (19) (20). W przypadku współczynnika wylęgu można stosować test Cochrana-Armitage'a, test dokładny Fishera (z korektą Bonferroniego) lub test Mantela-Haenszela.

Badanie graniczne

21. Jeśli we wstępnym badaniu ustalającym zakres nie zaobserwowano żadnych zmian, można przeprowadzić badanie graniczne (jedno stężenie badane i jedna próba kontrolna). Celem badania granicznego jest przeprowadzenie badania przy dostatecznie wysokim stężeniu substancji badanej, by umożliwić decydentom wykluczenie jej ewentualnych toksycznych skutków, a granicę ustala się na poziomie stężenia, co do którego nie przewiduje się, by mogło kiedykolwiek wystąpić. Zaleca się stężenie 1 000 mg/kg (w przeliczeniu na suchą masę). Zazwyczaj konieczne jest co najmniej 6 replikatów zarówno dla próby poddawanej działaniu substancji, jak i dla próby kontrolnej. Należy wykazać odpowiednią moc statystyczną, która pozwala wykryć 20 % różnicę w porównaniu z próbą kontrolną przy 5 % poziomie istotności (p = 0,05). Przy odpowiedzi metrycznej (współczynnik rozwoju i masa) odpowiednią metodą statystyczną jest test t-Studenta, jeśli dane spełniają warunki tego testu (normalność rozkładu zmiennych, jednorodność wariancji). Jeśli te warunki nie są spełnione, można zastosować test t dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, np. test Manna-Whitneya-Wilcoxona. W przypadku współczynnika wylęgu odpowiedni jest test dokładny Fishera.

PROCEDURA

Warunki narażenia na działanie substancji

Przygotowanie układu osad wzbogacony – woda

22. Dla podawania substancji badanej zalecana jest procedura wzbogacania opisana w metodzie badawczej C.8: Toksyczność dla dżdżownic (14). Osad wzbogacony umieszcza się w naczyniach, a następnie dodaje się wodę powyżej osadu, aby uzyskać współczynnik objętości osadu do wody równy 1:4 (zob. pkt 11 i 15). Głębokość warstwy osadu powinna znajdować się w przedziale 1,5-3 cm. Podczas dodawania badanej wody w celu uzyskania słupa wody nad osadem, aby uniknąć oddzielenia składników osadu i ponownego zawieszenia w wodzie drobnoziarnistego materiału, osad na czas zalewania można nakryć plastikowym krążkiem, a krążek następnie od razu usunąć. Właściwe może być także zastosowanie innych przyrządów.

23. Naczynia do badania powinny być przykryte (np. szklanymi płytkami). W razie konieczności w czasie badania poziom wody uzupełnia się do pierwotnej objętości, aby wyrównać jej ubytek spowodowany parowaniem. Należy w tym celu używać wody destylowanej lub dejonizowanej, aby zapobiec odkładaniu się soli.

▼M4

Stabilizacja

24. Po tym jak zostanie już przygotowany osad wzbogacony z warstwą wody powyżej, należy umożliwić podział substancji badanej między fazą wodną i osadem (3) (4) (6) (13). W miarę możliwości powinno się to odbywać w tych samych warunkach temperatury i napowietrzenia, co panujące w badaniu. Okres ustalania stanu równowagi zależy od osadu i substancji chemicznej, i może być rzędu kilku godzin lub kilku dni, a w rzadkich przypadkach trwać do kilku tygodni (4–5 tygodni). Jako że jest to czas wystarczający dla rozkładu wielu chemikaliów, nie oczekuje się stanu równowagi, ale zaleca się stosowanie 48-godzinnego okresu ustalania równowagi. Na koniec tego dalszego okresu ustalania równowagi należy zmierzyć stężenie substancji badanej w warstwie wody powyżej osadu, wodzie porowej i w osadzie, co najmniej przy najwyższym stężeniu i przy niższym stężeniu (zob. pkt 38). Takie oznaczenia analityczne substancji badanej umożlwiają obliczenie bilansu masy i wyrażenie wyników w oparciu o zmierzone stężenia.

Dodanie organizmów badanych

25. Na cztery do pięciu dni przed umieszczeniem organizmów badanych w naczyniach używanych do badania pakiety jaj należy wyjąć z hodowli i umieścić w małych naczyniach w pożywce hodowlanej. Można w tym celu zastosować pożywkę wykorzystywaną w hodowli podstawowej lub pożywkę świeżo przygotowaną. Jeśli stosowana jest ta ostatnia, do pożywki hodowlanej należy dodać niewielką ilość pokarmu, np. zielenice lub kilka kropel filtratu z drobno zmielonej zawiesiny pokarmu w płatkach dla ryb (zob. dodatek 2). Należy korzystać wyłącznie ze świeżo złożonych pakietów jaj. Wylęg larw zaczyna się przeważnie kilka dni po złożeniu pakietów jaj (2 do 3 dni w przypadku *Chironomus riparius* w temperaturze 20 °C oraz 1 do 4 dni w przypadku *Chironomus tentans* w temperaturze 23 °C i *Chironomus yoshimatsui* w temperaturze 25 °C), a wzrost larw następuje w czterech stadiach larwalnych, przy czym każde z nich trwa od 4 do 8 dni. Do badania należy stosować larwy w pierwszym stadium larwalnym (2–3 lub 1–4 dni po wylęgu). Stadium rozwoju kuczmanów można sprawdzić stosując pomiar szerokości puszki głowowej (6).

26. Dwadzieścia larw w pierwszym stadium larwalnym przydziela się losowo do każdego naczynia doświadczalnego zawierającego osad wzbogacony i wodę przy użyciu tępo zakończonej pipety. Po wprowadzeniu larw do naczyń należy zatrzymać napowietrzanie wody i nie uruchamiać go przez dobę po ich wprowadzeniu (zob. pkt 25 i 32). Zgodnie z zastosowanym projektem badania (zob. pkt 19 i 20) w celu oszacowania punktu EC należy zastosować co najmniej 60 larw na stężenie, a w celu oznaczenia wartości NOEC - 80 larw.

Badane stężenia

27. Badanie ustalające zakres może być przydatne do określenia zakresu stężeń dla ostatecznego badania. W tym celu stosuje się szereg roztworów o znacznie różniących się od siebie stężeniach substancji badanej. Aby zapewnić tę samą gęstość powierzchni na ochotkowate, co stosowana w ostatecznym badaniu, ochotkowate poddaje się narażeniu na każde stężenie substancji badanej przez okres pozwalający oszacować odpowiednie jej stężenie badane i nie wymagane są replikaty.

28. Decyzje dotyczące stężeń substancji badanej w ostatecznym badaniu podejmuje się w oparciu o wynik badania ustalającego zakres. Jak opisano w pkt 18 do 20, należy zastosować i wybrać co najmniej pięć stężeń.

▼M4

Próby kontrolne

29. Naczynia zawierające próby kontrolne bez substancji badanej, ale zawierające osad, powinny być uwzględnione w badaniu z odpowiednią liczbą replikatów (zob. pkt 19 i 20). Jeśli do wprowadzenia substancji badanej został użyty rozpuszczalnik (zob. pkt 16), należy dodać próbę kontrolną zawierającą osad z rozpuszczalnikiem.

Układ badawczy

30. Stosowane są układy statyczne. W wyjątkowych przypadkach, na przykład gdy określone w specyfikacjach cechy jakości wody staną się nieodpowiednie dla organizmu badanego lub naruszą równowagę chemiczną (np. poziomy rozpuszczonego tlenu spadną zbyt nisko, stężenie produktów wydalniczych za bardzo wzrośnie lub nastąpi uwalnianie minerałów z osadu, które wpłynie na wartość pH lub twardość wody) można stosować układy półstatyczne lub przepływowe z okresowym lub stałym odnawianiem wody powyżej osadu. Inne metody poprawy jakości wody powyżej osadu, np. napowietrzanie, zwykle jednak wystarczają i należy w miarę możliwości z nich korzystać.

Pokarm

31. Larwy trzeba karmić, w miarę możliwości codziennie lub co najmniej trzy razy w tygodniu. Odpowiedni do karmienia młodych larw przez pierwsze 10 dni wydaje się pokarm dla ryb (zawiesina w wodzie lub drobno zmielony pokarm, np. Tetra-Min lub Tetra-Phyll; zob. szczegółowe informacje w dodatku 2) w ilości 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg w przypadku *C. yoshimatsui*) na larwę dziennie. Starsze larwy mogą potrzebować nieco więcej pokarmu: 0,5-1 mg na larwę na dzień powinno być wystarczającą ilością przez pozostałą część badania. Jeśli obserwuje się wzrost grzybów lub śmiertelność w próbach kontrolnych, należy wówczas we wszystkich próbach kontrolnych i doświadczalnych ograniczyć i kontrolować ilość pokarmu. Jeśli nie można powstrzymać rozwoju grzybów, należy powtórzyć badanie. Przy badaniu substancji silnie adsorbujących (np. o log K_{ow} > 5) lub w przypadku substancji tworzących wiązanie kowalencyjne z osadem, ilość pokarmu niezbędną do zapewnienia przeżycia i naturalnego wzrostu organizmów można dodać do osadu preparowanego przed okresem stabilizacji. W tym celu zamiast pokarmu dla ryb należy stosować surowiec roślinny, np. dodatek 0,5 % (w przeliczeniu na suchą masę) drobno zmielonych liści np. pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*), morwy białej (*Morus alba*), koniczyny białej (*Trifolium repens*), szpinaku (*Spinacia oleracea*), można też użyć innego surowca roślinnego (produktu Cerophyl lub alfa-celulozy).

Warunki inkubacji

32. W miarę możliwości w ciągu 24 godzin od wprowadzenia larw należy zapewnić delikatne napowietrzanie warstwy wody powyżej osadu w naczyniach do badania, a następnie kontynuować je przez cały okres badania (należy dopilnować, by stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadło poniżej 60 procent ASV). Napowietrzanie prowadzone jest z użyciem szklanej pipety Pasteura przytwierdzonej 2-3 cm nad warstwą osadu (tj. w ilości jednego lub kilku bąbli powietrza/sek.). Przy badaniu lotnych chemikaliów można rozważyć nienapowietrzanie układu osad-woda.

33. Badanie przeprowadza się w stałej temperaturze 20 °C (± 2 °C). Zalecane temperatury w przypadku *C. tentans* i *C. yoshimatsui* to odpowiednio 23 °C i 25 °C (± 2 °C). Stosuje się 16-godzinny fotoperiod, a natężenie światła powinno wynosić od 500 do 1 000 luksów.

▼M4

Czas trwania narażenia

34. Czas trwania narażenia rozpoczyna się od wprowadzenia larw do naczyń z próbą wzbogaconą i naczyń zawierających próby kontrolne. Maksymalny czas trwania narażenia wynosi 28 dni w przypadku *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a w przypadku *C. tentans* 65 dni. Jeśli kuczmany wylęgną się wcześniej, badanie można zakończyć po co najmniej pięciu dniach od wylęgu ostatniego dorosłego osobnika w próbie kontrolnej.

Obserwacje

Wylęg osobników dorosłych

35. Należy określić czas rozwoju i całkowitą liczbę w pełni wylęgniętych samców i samic kuczmanów. Samce łatwo zidentyfikować dzięki ich pierzastym czułkom.

36. Naczynia do badania należy obserwować co najmniej trzy razy w tygodniu w celu wzrokowej oceny ewentualnego nieprawidłowego zachowania (np. porzucanie osadu, nietypowy sposób pływania) w porównaniu z próbą kontrolną. W okresie spodziewanego wylęgu kuczmanów konieczne jest codzienne ich zliczanie. Płeć i liczbę w pełni wylęgniętych kuczmanów należy zapisywać codziennie. Po identyfikacji kuczmany usuwane są z naczyń. Pakiety jaj złożone przed zakończeniem badania należy odnotować, a następnie usunąć, by zapobiec ponownemu wprowadzeniu larw do osadu. Należy także odnotować liczbę widocznych poczwarek, z których nie wylęgły się kuczmany. Wytyczne dotyczące pomiaru wylęgu zawarte są w dodatku 5.

Wzrost i przeżycie

37. Jeśli mają być dostarczone dane dotyczące 10-dniowego przeżycia i wzrostu larw, należy na początku włączyć do badania dodatkowe naczynia, by mogły być w tym celu wykorzystane. Aby zebrać larwy, osad z tych dodatkowych naczyń należy przesiać, używając sita 250 μm. Kryteriami zgonu są nieruchomość lub brak reakcji na bodziec mechaniczny. Larwy nieodzyskane należy także liczyć jako martwe (larwy, które padły na początku badania, mogły zostać rozłożone przez drobnoustroje). Należy określić suchą masę (bez popiołu) larw pozostałych przy życiu na każde naczynie do badania i obliczyć średnią suchą masę pojedynczej larwy na każde naczynie. Przydatne jest określenie, w którym stadium larwalnym znajdują się larwy pozostałe przy życiu; w tym celu można stosować pomiar puszki głowowej każdego osobnika.

Pomiary analityczne

Stężenie substancji badanej

38. Przed rozpoczęciem badania (np. wprowadzeniem larw) z co najmniej jednego naczynia na każde doświadczenie pobiera się próbki całej objętości osadu w celu dokonania pomiarów analitycznych stężenia substancji badanej w osadzie. Zaleca się, by na początku i na końcu badania przeanalizować co najmniej próbki wody z warstwy powyżej osadu, wody porowej i osadu (zob. pkt 24), przy najwyższym stężeniu i przy niższym stężeniu. Takie oznaczenie stężenia substancji badanej daje wiedzę na temat zachowania/podziału substancji badanej w układzie woda-osad.

39. Gdy dokonuje się pomiarów pośrednich (np. w 7. dniu) lub jeśli do analizy potrzeba dużych próbek, których nie można pobrać z naczyń do badania bez wpływania na układ badawczy, należy dokonać oznaczeń analitycznych na próbkach pochodzących z dodatkowych naczyń do badania przygotowanych w ten sam sposób (zawierających także organizmy badane), ale niewykorzystywanych do obserwacji biologicznych.

▼M4

40. Aby oddzielić wodę porową, zaleca się odwirowanie osadu przy 10 000 g w temp. 4 °C przez 30 min. Jeśli jednak substancja badana nie adsorbuje się na filtrze, dopuszczalna jest też filtracja. W niektórych przypadkach zanalizowanie stężeń w wodzie porowej może nie być możliwe, ponieważ wielkość próbki jest zbyt mała.

Parametry fizykochemiczne

41. Wartość pH i temperatura w naczyniach do badania powinny być odpowiednio mierzone (zob. pkt 10). Twardość i zawartość amoniaku należy zmierzyć w próbach kontrolnych i w jednym naczyniu do badania przy najwyższym stężeniu na początku i na końcu badania.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

42. Celem badania jest określenie wpływu substancji badanej na współczynnik rozwoju i całkowitą liczbę w pełni wylęgniętych samic i samców kuczmanów lub, w przypadku badań 10-dniowych, skutków dla przeżycia i masy larw. Jeśli nie ma wskazań dotyczących statystycznie istotnych różnic we wrażliwości osobników każdej płci, wyniki dotyczące osobników męskich i żeńskich mogą zostać połączone do celów analizy statystycznej. Różnice we wrażliwości między płciami można oszacować statystycznie z wykorzystaniem np. tablicy rozkładu chi-kwadrat χ^2-r × 2. W razie konieczności przeżycie larw i średnią suchą masę larwy na naczynie należy określić po 10 dniach.

43. Wartości stężeń powodujące zmiany, wyrażone w suchej masie, należy obliczyć w miarę możliwości w oparciu o zmierzone stężenia substancji w osadzie na początku badania (zob. pkt 38).

44. Aby obliczyć oszacowanie punktowe dla EC_{50} i innych EC_x, jako prawdziwe replikaty można wykorzystywać dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyń. Przy wyliczaniu przedziału ufności dla EC_x należy uwzględnić zmienność między naczyniami lub należy wykazać, że zmienność ta jest tak niewielka, że można ją pominąć. Jeżeli model został dopasowany przy użyciu metody najmniejszych kwadratów, do danych statystycznych dotyczących poszczególnych naczyń należy zastosować przekształcenie, aby poprawić jednorodność wariancji. Wartości EC_x należy jednak liczyć po przekształceniu odpowiedzi z powrotem do wartości pierwotnej.

45. W przypadku gdy analiza statystyczna ma na celu określenie wartości NOEC/LOEC przez zastosowanie badania hipotezy statystycznej, należy wziąć pod uwagę zmienność między naczyniami, np. przez zastosowanie zagnieżdżonej analizy wariancji. Ewentualnie w przypadkach, w których występują naruszenia zwykłych założeń analizy wariancji, odpowiednie mogą być bardziej odporne testy (21).

Współczynnik wylęgu

46. W przypadku gdy oczekuje się monotonicznej zależności dawka-odpowiedź, a dane te są spójne z tym oczekiwaniem, współczynniki wylęgu, które są danymi dwuwartościowymi, można zanalizować z użyciem testu Cochrana-Armitage'a stosowanego na zasadzie krokowej wstecznej. W innym przypadku można zastosować test dokładny Fishera lub test Mantela-Haenszela z granicznym poziomem istotności skorygowanym metodą Bonferroniego-Holma. Jeśli są dowody na większą zmienność między replikatami w ramach tego samego stężenia, niż wskazywałby na to rozkład dwumianowy (co określa się często jako zmienność większą niż zmienność w rozkładzie dwumianowym), wówczas należy zastosować odporny test Cochrana-Armitage'a lub test dokładny Fishera, tak jak proponuje się w pozycji (21) w bibliografii.

▼M4

Suma kuczmanów wylęgniętych na każde naczynie, n_e, jest określana i dzielona przez liczbę wprowadzonych larw, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

gdzie:

ER = współczynnik wylęgu,

n_e = liczba wylęgniętych kuczmanów na każde naczynie,

n_a = liczba wprowadzonych larw na każde naczynie.

47. Najwłaściwszą alternatywą w przypadku dużych próbek, w których występuje wariancja większa niż wariancja w rozkładzie dwumianowym, jest traktowanie współczynnika wylęgu jako zmiennej ciągłej i stosowanie takich procedur jak test Williama, gdy oczekuje się monotonicznej zależności dawka-odpowiedź i oczekiwanie to jest zgodne z danymi dotyczącymi współczynnika wylęgu. Jeśli założenie dotyczące monotoniczności nie jest spełnione, odpowiedni byłby test Dunnetta. Uznaje się, że próbka jest duża, gdy zarówno liczba wylęgniętych kuczmanów, jak i liczba larw, z których one nie powstały, przekracza pięć na każde naczynie stanowiące replikat.

48. Aby zastosować metody analizy wariancji, wartości współczynnika wylęgu należy najpierw przekształcić, stosując przekształcenie pierwiastkowe i arcsin lub przekształcenie Freemana-Tukeya w celu otrzymania przybliżonego normalnego rozkładu i wyrównania wariancji. Przy użyciu częstości bezwzględnej można zastosować test Cochrana-Armitage'a, test dokładny Fishera (z korektą Bonferroniego) lub test Mantela-Haenszela. Przekształcenie pierwiastkowe i arcsin stosuje się przez wyznaczenie funkcji odwrotnej względem sinusa ($\sin^{-1}$) pierwiastka współczynnika wylęgu.

49. W przypadku współczynników wylęgu wartości EC_x oblicza się, stosując analizę regresji (lub np. analizę probitową (22), logitową, analizę Weibulla, odpowiednie oprogramowanie komercyjne itd.). Jeśli analiza regresji zawodzi (np. w przypadku gdy występują mniej niż dwie częściowe odpowiedzi), stosuje się inne metody nieparametryczne, takie jak średnia krocząca lub prosta interpolacja.

Współczynnik rozwoju

50. Średnia czasu rozwoju to średni czas od wprowadzenia larw (dzień 0 badania) do wylęgu kuczmanów tworzących kohortę badaną (w celu policzenia rzeczywistego czasu rozwoju należy uwzględnić wiek larw w chwili wprowadzenia). Współczynnik rozwoju stanowi odwrotność czasu rozwoju (jednostka: 1/dzień) i przedstawia tę część rozwoju larwy, która następuje każdego dnia. Do celów oceny omawianych badań dotyczących toksyczności w osadzie preferowany jest współczynnik rozwoju, jako że jego wariancja jest mniejsza, jest bardziej jednorodny i bliższy normalnemu rozkładowi w porównaniu z czasem rozwoju. Dlatego silne metody parametryczne badania stosować można raczej w odniesieniu do współczynnika rozwoju niż do czasu rozwoju. Dla współczynnika rozwoju jako odpowiedzi ciągłej można szacować wartości EC_x, stosując analizę regresji (zob. np. (23) (24)).

51. Do celów poniższych badań statystycznych przyjmuje się, że liczba kuczmanów zaobserwowanych w dniu kontroli x wylęgła się w średniej arytmetycznej odstępu czasu między dniem x a dniem x-1 (1 = długość odstępu czasowego między kontrolami, zwykle 1 dzień). Średnia arytmetyczna współczynnika rozwoju na każde naczynie (x) liczona jest według następującego wzoru:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

gdzie:

$\bar{x}$: średnia arytmetyczna współczynnika rozwoju na każde naczynie,

i: wskaźnik odstępu czasowego między kontrolami,

m: maksymalna liczba odstępów czasowych między kontrolami,

f_i: liczba kuczmanów wylęgniętych w odstępie czasowym między kontrolami *i,*

n_e: całkowita liczba kuczmanów wylęgniętych na koniec doświadczenia, $(= \sum f_i)$

x_i: współczynnik rozwoju kuczmanów wylęgniętych w odstępie czasowym między kontrolami *i,*

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

gdzie:

day_i: dzień kontroli (dni od wprowadzenia),

l_i: długość odstępu czasowego między kontrolami *i* (w dniach, zwykle 1 dzień).

Sprawozdanie z badania

52. Sprawozdanie z badania musi zawierać co najmniej następujące informacje:

Substancja badana

— cechy fizyczne i w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (rozpuszczalność w wodzie, prężność par, współczynnik podziału w glebie (lub w osadzie, jeśli jest dostępny), stabilność w wodzie itd.),

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej (nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna, numer CAS, wzór strukturalny) w tym czystość i metoda analityczna oznaczania ilościowego substancji badanej.

Badany gatunek

— zwierzęta wykorzystane w badaniu: gatunek, nazwa naukowa, źródło organizmów i warunki hodowli,

— informacje dotyczące postępowania z pakietami jaj i larwami,

— wiek zwierząt badanych w chwili umieszczenia w naczyniu do badania.

Warunki badania

— użyty osad, tj. osad naturalny lub preparowany,

— w przypadku osadu naturalnego – lokalizacja i opis miejsca pobrania próbki osadu, w tym, jeśli to możliwe, historia zanieczyszczenia; charakterystyka: pH, zawartość węgla organicznego, stosunek C/N i granulometria (w stosownych przypadkach),

— przygotowanie osadu preparowanego: składniki i charakterystyka (zawartość węgla organicznego, pH, wilgotność itd. na początku badania),

— przygotowanie wody do badania (jeśli stosowana jest woda regenerowana) i jej charakterystyka (stężenie tlenu, pH, przewodność właściwa, twardość itd. na początku badania),

— głębokość warstwy osadu i warstwy wody powyżej,

— objętość warstwy wody powyżej osadu i wody porowej; masa mokrego osadu z wodą porową i bez niej,

▼M4

— naczynia do badania (materiał i wielkość),

— metoda wzbogacania osadu: użyte stężenia badane, liczba replikatów i użyty rozpuszczalnik, jeśli go zastosowano,

— faza stabilizacji i równowagi układu wzbogacony osad-woda: czas trwania i warunki,

— warunki inkubacji: temperatura, cykl i natężenie oświetlenia, napowietrzanie (częstotliwość i natężenie),

— szczegółowe informacje o żywieniu, w tym rodzaj pokarmu, przygotowanie, schemat żywienia i ilość pokarmu.

Wyniki

— nominalne stężenia badane, zmierzone stężenia badane i wyniki wszystkich analiz ustalających stężenia substancji badanej w naczyniach do badań,

— jakość wody w naczyniach do badania, tj. pH, temperatura, rozpuszczony tlen, twardość i zawartość amoniaku,

— uzupełnienie wyparowanej wody do badania, jeśli nastąpiło,

— liczbę wylęgniętych męskich i żeńskich kuczmanów na każde naczynie na każdy dzień,

— liczba larw, z których nie nie wylęgły się kuczmany, na każde naczynie,

— w stosownych przypadkach, średnia sucha masa larw na każde naczynie do badania i na każde stadium larwalne,

— odsetek wylęgniętych kuczmanów na każdy replikat i na każde stężenie substancji badanej (samice i samce kuczmanów łącznie),

— średni współczynnik rozwoju w pełni wylęgniętych kuczmanów na każdy replikat i współczynnik poddania działaniu substancji badanej (samice i samce kuczmanów łącznie),

— oszacowania toksycznych punktów końcowych, np. EC_x (i powiązane przedziały ufności), wartość stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub najniższe stężenie, przy którym obserwuje się szkodliwe zmiany (LOEC) oraz metody statystyczne użyte w celu ich określenia,

— omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. M. Streloke i H. Köpp (red.). Berlin 1995.

(2) Fleming R i in. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Sprawozdanie końcowe dla Komisji Europejskiej. Nr sprawozdania: EC 3738. Sierpień 1994. WRc, Zjednoczone Królestwo.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Materiały z warsztatów WOSTA zorganizowanych w Niderlandach.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. W: ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Tom 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. Sprawozdanie SPE 1/RM/32. Grudzień 1997.

▼**M4**

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Wyd. drugie. EPA 600/R-99/064. Marzec 2000. Zmiana wydania pierwszego z czerwca 1994 r.

(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, Kanada.

(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 nr 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Sprawozdanie EPS 1/RM/30. Wrzesień 1995 r.

(14) Metoda badawcza C.8 z niniejszego załącznika: Toksyczność dla dżdżownic.

(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**

Dodatek 1

DEFINICJE

Dla celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Osad preparowany lub regenerowany, sztuczny lub syntetyczny, stanowi mieszaninę materiałów używaną do naśladowania składników fizycznych naturalnego osadu.

Warstwa wody powyżej osadu to woda, którą zalano osad w naczyniu do badania.

Woda porowa to woda wypełniająca przestrzeń między cząstkami osadu i gleby.

Osad wzbogacony to osad, do którego dodano substancję badaną.

Badana substancja chemiczna: każda substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M4

Dodatek 2

Zalecenia dotyczące hodowli *Chironomus riparius*

1. Larwy ochotki (*Chironomus*) można hodować w naczyniach krystalizacyjnych lub większych zbiornikach. Na dnie zbiornika rozprowadza się drobny piasek kwarcowy, tworząc cienką warstwę grubości od 5 do 10 mm. Odpowiednim substratem okazała się także ziemia okrzemkowa (np. Merck, Art 8117), w przypadku której wystarczająca jest cieńsza warstwa grubości najwyżej kilku milimetrów. Następnie dodaje się odpowiednią wodę na głębokość kilku centymetrów. Poziomy wody należy uzupełniać, aby wyrównać stratę spowodowaną parowaniem i zapobiec wysychaniu. Wodę w razie konieczności można zastępować. Należy zapewnić delikatne napowietrzanie. Naczynia do chowu larw należy przechowywać w odpowiedniej klatce, aby zapobiec ucieczce wylęgniętych osobników dorosłych. Klatka powinna być na tyle duża, by umożliwić rojenie wylęgniętych osobników dorosłych, inaczej może nie dojść do kopulacji (co najmniej ok. 30 × 30 × 30 cm).

2. Klatki powinny być trzymane w temperaturze pokojowej lub w pomieszczeniu o stałych warunkach środowiska w temperaturze 20 ± 2 °C z fotoperiodem wynoszącym 16 godzin światła (o natężeniu ok. 1 000 luksów) i 8 godzin ciemności. Odnotowywano, że wilgotność powietrza mniejsza niż 60 % RH może przeszkodzić rozmnażaniu.

Woda do rozcieńczania

3. Można stosować każdy rodzaj wody naturalnej lub syntetycznej. Powszechnie stosowana jest woda gruntowa, odchlorowana woda wodociągowa i sztuczne pożywki (np. pożywka Elendta „M4” lub „M7”, zob. także poniżej). Woda przed użyciem powinna być napowietrzona. W miarę potrzeby woda do hodowli może być odnawiana przez ostrożne odlewanie lub wypłukiwanie zużytej wody z naczyń hodowlanych bez niszczenia oprzędów larw.

Karmienie larw

4. Larwy *Chironomus* należy karmić pokarmem w płatkach dla ryb (Tetra Min®, Tetra Phyll® lub innej marki pokarmem dla ryb) w ilości ok. 250 mg na każde naczynie na dzień. Można go podawać w postaci suchego mielonego proszku lub jako zawiesinę w wodzie: 1 g pokarmu w płatkach dodaje się do 20 ml wody do rozcieńczenia i rozdrabnia się do uzyskania jednorodnej mieszanki. Preparat ten można stosować jako pokarm w ilości ok. 5 ml na każde naczynie na dzień (przed użyciem wstrząsnąć). Starsze larwy mogą dostawać go więcej.

5. Żywienie dostosowuje się do jakości wody. Jeśli pożywka do hodowli staje się mętna, należy ograniczyć karmienie. Podawanie pokarmu należy starannie monitorować. Zbyt mała ilość pożywienia spowoduje migrację larw w kierunku słupa wody, a zbyt duża wywoła zwiększoną aktywność drobnoustrojów i zmniejszone stężenie tlenu. Oba rodzaje warunków mogą spowodować ograniczenie współczynnika wzrostu.

6. Przy przygotowywaniu nowych naczyń do hodowli można też dodać komórki niektórych gatunków zielenic (np. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Karmienie wylęgniętych osobników dorosłych

7. Niektórzy badacze sugerują, by do karmienia wylęgniętych osobników dorosłych używać tamponu z wełny bawełnianej nasączonego nasyconym roztworem sacharozy.

▼M4

Wylęg osobników dorosłych

8. Przy temperaturze 20 ± 2 °C po ok. 13–15 dniach w naczyniach do hodowli z larw wylęgną się osobniki dorosłe. Samce łatwo zidentyfikować dzięki pierzastym czułkom.

Pakiety jaj

9. Po tym, jak osobniki dorosłe pojawią się w klatce hodowlanej, należy trzy razy w tygodniu sprawdzać we wszystkich naczyniach do chowu larw, czy nie zostały złożone galaretowate pakiety jaj. Jeśli tak, należy je ostrożnie usunąć, a następnie przenieść do niewielkiego naczynia zawierającego próbkę wody używanej do hodowli. Pakiety jaj wykorzystuje się do zapoczątkowania hodowli w nowym naczyniu (np. od 2 do 4 pakietów jaj na naczynie) lub do badań toksyczności.

10. Larwy w pierwszym stadium larwalnym powinny wylęgnąć się po 2–3 dniach.

Przygotowanie hodowli w nowych naczyniach

11. Po tym, jak hodowle zostaną założone, powinno być możliwe przygotowanie nowej hodowli larw w świeżym naczyniu raz na tydzień lub rzadziej, w zależności od wymogów badania, przy czym starsze naczynia, po wylęgnięciu się w nich dorosłych kuczmanów, usuwa się. Stosując ten układ, uzyskuje się stałą podaż dorosłych osobników przy zminimalizowaniu zarządzania.

Przygotowanie roztworów testowych „M4” i „M7”

12. Pożywka „M4” została opisana przez Elendta (1990). Pożywkę „M7” przygotowuje się jak pożywkę „M4”, z wyjątkiem substancji wskazanych w tabeli 1, których stężenie w „M7” jest czterokrotnie mniejsze niż w „M4”. Publikacja na temat pożywki „M7” znajduje się w przygotowaniu (Elendt, informacje własne). Roztwór testowy nie powinien być przygotowywany zgodnie z instrukcjami Elendta i Biasa (1990), ponieważ stężenia $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 oraz K_2HPO_4 podane dla przygotowania roztworów podstawowych nie są odpowiednie.

Przygotowanie pożywki „M7”

13. Każdy roztwór podstawowy (I) przygotowuje się oddzielnie, a z roztworów podstawowych (I) przygotowuje się łączony roztwór podstawowy (II) (zob. tabela 1). Pięćdziesiąt ml łączonego roztworu podstawowego (II) oraz podane w tabeli 2 ilości każdego roztworu podstawowego makroskładnika odżywczego dopełnia się do 1 litra wodą dejonizowaną, aby przygotować pożywkę „M7”. Roztwór podstawowy witamin przygotowuje się przez dodanie trzech witamin do wody dejonizowanej, jak wskazano w tabeli 3. Do końcowej pożywki „M7” na krótko przed użyciem dodaje się 0,1 ml łączonego roztworu podstawowego witamin (roztwór podstawowy witamin przechowuje się zamrożony w małych podwielokrotnościach.) Pożywka jest napowietrzana i stabilizowana.

BIBLIOGRAFIA

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**

Tabela 1

Roztwory podstawowe pierwiastków śladowych dla pożywek M4 i M7

Roztwory podstawowe (I)	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną	W celu przygotowania łączonego roztworu podstawowego (II): zmieszać następujące ilości (ml) roztworów podstawowych (I) i dopełnić do 1 litra wodą dejonizowaną		Końcowe stężenia w roztworach testowych (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) Te substancje różnią się w przypadku M4 i M7, jak określono wyżej.
(2) Roztwory te są przygotowywane oddzielnie, następnie zlewane razem i niezwłocznie autoklawowane.

Tabela 2

Roztwory podstawowe makroskładników odżywczych w przypadku pożywek M4 i M7

	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną	Ilość (ml/l) roztworów podstawowych makroskładników odżywczych w celu przygotowania pożywek M4 i M7	Końcowe stężenia (mg/l) w roztworach testowych pożywek M4 i M7
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	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**

Tabela 3

Roztwór podstawowy witamin dla pożywek M4 i M7. Wszystkie trzy roztwory witamin łączy się, by otrzymać jeden roztwór podstawowy witamin

	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną (mg)	Ilość (ml/l) roztworu podstawowego witamin dodawanego w celu przygotowania pożywek M4 i M7	Końcowe stężenia (mg/l) w roztworach testowych pożywek M4 i M7
Hydrochlorek tiaminy	750	0,1	0,075
Cyjanokobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotyna	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAFIA

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt, B.P. i 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

Dodatek 3

PRZYGOTOWANIE OSADU PREPAROWANEGO

Skład osadu

Skład osadu preparowanego powinien być następujący:

Składnik	Właściwości	% suchej masy osadu
Torf	Torf z rozkładu mchu torfowca (Sphagnum), w miarę możliwości o wartości pH równej 5,5–6,0, bez widocznych pozostałości roślin, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 1 mm), suszony powietrzem	4–5
Piasek kwarcowy	Wielkość ziaren: > 50 % cząstek powinna mieścić się w przedziale 50–200 μm.	75–76
Glinka kaolinowa	Zawartość kaolinitu ≥ 30 %	20
Węgiel organiczny	Skorygowana przez dodanie torfu i piasku	2 (± 0,5)
Węglan wapnia	$CaCO_3$, sproszkowany, chemicznie czysty	0,05–0,1
Woda	Przewodność właściwa ≤ 10 μS/cm	30–50

Przygotowanie

Torf suszy się powietrzem i mieli na drobny proszek. Zawiesinę wymaganej ilości proszku torfowego w wodzie dejonizowanej przygotowuje się z użyciem wysokosprawnego urządzenia do homogenizacji. Wartość pH zawiesiny koryguje się z użyciem $CaCO_3$ do poziomu 5,5 ± 0,5. W celu ustabilizowania pH i komponentu mikrobiologicznego zawiesinę kondycjonuje się przez co najmniej dwa dni w temperaturze 20 ± 2 °C, delikatnie ją mieszając. Ponownie mierzy się pH, którego wartość powinna wynosić 6,0 ± 0,5. Następnie zawiesinę torfową miesza się z innymi składnikami (piaskiem i glinką kaolinową) oraz wodą dejonizowaną, aby otrzymać jednorodny osad z zawartością wody w przedziale 30–50 procent suchej masy osadu. Wartość pH końcowej mieszaniny ponownie mierzy się i koryguje w miarę potrzeby za pomocą $CaCO_3$ do poziomu 6,5 do 7,5. Próbki osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość węgla organicznego. Następnie przed ich wykorzystaniem w badaniu toksyczności dla ochotkowatych zaleca się, by osad preparowany kondycjonować przez siedem dni w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania.

Przechowywanie

Suche składniki do przygotowywania osadu sztucznego mogą być przechowywane w suchym i chłodnym miejscu w temperaturze pokojowej. Nie powinno się przechowywać (mokrego) osadu preparowanego przed jego użyciem w badaniu. Osad należy wykorzystać natychmiast po 7-dniowym okresie kondycjonowania, kończącym proces jego przygotowania.

BIBLIOGRAFIA

Rozdział C.8 niniejszego załącznika. Toksyczność dla dżdżownic.

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**

Dodatek 4

Właściwości chemiczne dopuszczalnej wody do rozcieńczania

Substancja	Stężenia
Cząstki stałe	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 mg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 µg/l
Twardość w przeliczeniu na $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Chlor resztkowy	< 10 µg/l
Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych	< 50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych plus polichlorowanych bifenyli	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l

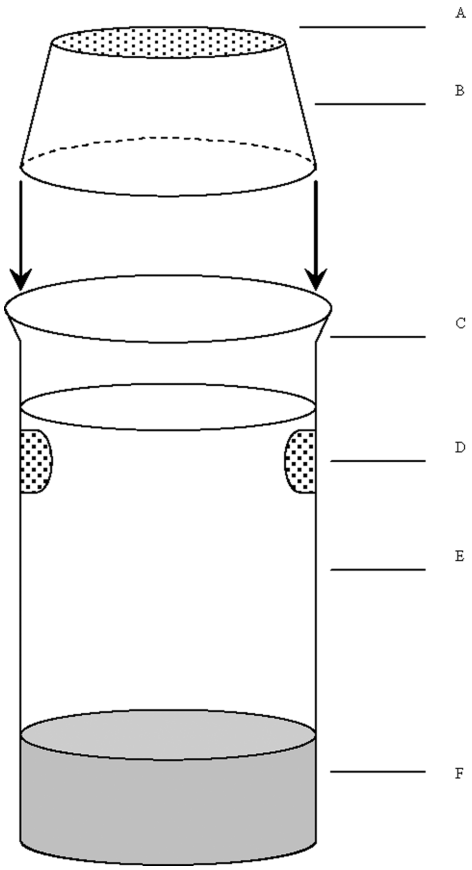
(*) Należy jednak pamiętać, że jeżeli podejrzewa się interakcję między jonami powodującymi twardość wody a substancją badaną, powinna być stosowana woda o mniejszej twardości (a zatem w takim przypadku nie wolno używać pożywki Elendta M4).

▼**M4**

Dodatek 5

Wytyczne dotyczące monitorowania wylęgu larw ochotkowatych

Na szklanych zlewkach do badania umieszczono pułapki na wylęgnięte kuczmany. Pułapki te potrzebne są od 20 dnia badania do zakończenia badania. Poniżej przedstawiono rysunek przedstawiający przykładową pułapkę:



A: siatka nylonowa

B: odwrócone kubeczki plastikowe

C: zlewka do badania bez dzióbka

D: osiatkowane otwory do wymiany wody

E: woda

F: osad

▼M4

C.28. BADANIE TOKSYCZNOŚCI W UKŁADZIE OSAD-WODA NA OCHOTKOWATYCH Z WYKORZYSTANIEM WZBOGACONEJ WODY

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 219 (OECD TG 219) (2004). Niniejszą metodę badawczą zaprojektowano, by ocenić skutki przedłużonego narażenia na działanie chemikaliów na żyjących w osadach larw *Chironomus* sp., należących do rzędu słodkowodnych muchówek. Jest ona oparta głównie na wytycznych BBA dotyczących układu badawczego osad-woda z użyciem sztucznej gleby oraz na scenariuszu narażenia w słupie wody (1). Uwzględnia się w niej również protokoły badania toksyczności obowiązujące dla *Chironomus riparius* i *Chironomus tentans*, które opracowano w Europie i Ameryce Płn. (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) i potwierdzono w badaniu międzylaboratoryjnym (1) (6) (9). Można także wykorzystywać inne dobrze udokumentowane gatunki ochotkowatych, np. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Scenariusz narażenia stosowany w tej metodzie badawczej polega na wzbogacaniu wody substancją badaną. Wybór odpowiedniego scenariusza narażenia zależy od zamierzonego zastosowania badania. Scenariusz narażenia w wodzie, polegający na wzbogacaniu słupa wody, służy do symulowania znoszenia cieczy roboczej w przypadku pestycydów i obejmuje początkowy szczyt stężenia w wodzie porowej. Jest on również przydatny w odniesieniu do innych rodzajów narażenia (w tym wycieków chemicznych), z wyjątkiem procesów akumulacji trwających dłużej niż okres badania.

3. Substancje, które należy przebadać pod kątem organizmów żyjących w osadach, zwykle pozostają w tym układzie przez długi czas. Organizmy żyjące w osadach mogą być narażane na działanie substancji kilkoma drogami. Względne znaczenie danej drogi narażenia i czas, jaki jest potrzebny, by przyczyniła się ona do ogólnych skutków toksycznych, zależy od fizykochemicznych właściwości danej substancji chemicznej. W przypadku substancji silnie adsorbujących (np. substancji o log K_{ow} > 5) lub w przypadku substancji tworzących wiązanie kowalencyjne z osadami znaczącą drogą narażenia może być przyjmowanie zanieczyszczonego pokarmu. Aby zapobiec niedoszacowaniu toksyczności wysokolipofilowych substancji, można rozważyć zastosowanie pokarmu dodawanego do osadu przed wprowadzeniem substancji badanej. Aby uwzględnić wszelkie możliwe drogi narażenia, niniejsza metoda badawcza ukierunkowana jest na narażenie długoterminowe. Badanie trwa od 20 do 28 dni w przypadku *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a w przypadku *C. tentans* od 28 do 65 dni. Jeśli do określonego celu potrzebne są dane krótkoterminowe, na przykład w celu zbadania skutków działania substancji niestabilnych, po okresie dziesięciu dni można usunąć dodatkowe replikaty.

4. Mierzone punkty końcowe to całkowita liczba wylęgniętych dorosłych osobników i czas do wylęgu. Jeśli potrzebne są dodatkowe dane krótkoterminowe, zaleca się, by pomiarów przeżycia i wzrostu larw dokonywać po okresie dziesięciu dni, korzystając w stosownych przypadkach z dodatkowych replikatów.

5. Zalecane jest stosowanie osadów preparowanych. Osady preparowane są korzystniejsze od osadów naturalnych z kilku względów:

   — zmienność eksperymentalna jest ograniczona, ponieważ osad preparowany stanowi odtwarzalną „zestandaryzowaną matrycę", tak że wyeliminowana zostaje potrzeba znalezienia źródeł niezanieczyszczonego i czystego osadu,

   — badania można rozpocząć w każdej chwili, unikając zmienności sezonowej badanego osadu, i nie jest konieczna wstępna obróbka osadu w celu usunięcia rodzimej fauny; stosowanie osadu preparowanego zmniejsza także koszty związane ze zbieraniem w terenie dostatecznych ilości osadu na potrzeby rutynowych badań,

▼M4

— zastosowanie osadu preparowanego umożliwia porównanie toksyczności i stosowną klasyfikację substancji: dane dotyczące toksyczności pochodzące z badań z osadami naturalnymi i sztucznymi były porównywalne dla kilku substancji chemicznych (2).

6. Definicje są zamieszczone w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

7. Larwy ochotkowatych w pierwszym stadium larwalnym poddawane są działaniu substancji badanej w różnych stężeniach w układach osad-woda. Badanie rozpoczyna się od umieszczenia larw w pierwszym stadium larwalnym w zlewkach do badania zawierających układ osad-woda, a następnie wzbogaca się wodę w substancję badaną. Na końcu badania mierzy się współczynnik wylęgu i rozwoju ochotkowatych. W miarę potrzeby przeżycie i masa larw mogą być także mierzone po 10 dniach (z wykorzystaniem w stosownych przypadkach dodatkowych replikatów). Dane te analizowane są przy użyciu modelu regresji w celu oszacowania stężenia, które spowodowałoby zmniejszenie wylęgu, przeżycia lub wzrostu larw o x % (np. EC_{15}, EC_{50} itd.) albo przez testowanie hipotez statystycznych w celu określenia stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub najniższego stężenia, przy którym obserwuje się szkodliwe zmiany (LOEC). To ostatnie wymaga porównania wartości zmian z wartościami kontrolnymi z użyciem badań statystycznych.

INFORMACJE NA TEMAT SUBSTANCJI BADANEJ

8. Należy znać rozpuszczalność substancji badanej w wodzie, prężność par, podział substancji w osadzie oraz jej stabilność w wodzie i osadzie, uzyskane w wyniku pomiarów lub obliczeń. Powinna być dostępna wiarygodna metoda analityczna do oznaczania ilościowego substancji badanej w osadzie, wodzie porowej i warstwie wody powyżej osadu ze znaną i udokumentowaną dokładnością oraz granicą wykrywalności. Użyteczne informacje obejmują wzór strukturalny i czystość substancji badanej. Do przydatnych informacji należą także dane dotyczące chemicznych losów substancji w środowisku (np. jej rozpraszanie, rozkład abiotyczny i biotyczny itd.). Dalsze wskazówki dotyczące badania substancji o własnościach fizykochemicznych utrudniających ich badanie podano w pozycji (12) w bibliografii.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

9. Substancje odniesienia mogą być okresowo badane dla zagwarantowania, że protokół i warunki badania są rzetelne. Przykłady substancji toksycznych stosowanych z powodzeniem w badaniach międzylaboratoryjnych i walidacyjnych: lindan, trifluralina, pentachlorofenol, chlorek kadmu i chlorek potasu (1) (2) (5) (6) (13).

WAŻNOŚĆ BADANIA

10. Aby badanie było ważne, obowiązują następujące warunki:

— odsetek wylęgniętych osobników dorosłych w próbach kontrolnych musi na końcu badania być co najmniej na poziomie 70 % (1) (6),

— w naczyniach zawierających próby kontrolne wylęg osobników dorosłych *C. riparius* i *C. yoshimatsui* z larw powinien nastąpić między 12. a 23. dniem od ich wprowadzenia do naczynia; w przypadku *C. tentans* niezbędny jest okres od 20 do 65 dni,

— na końcu badania należy zmierzyć wartość pH oraz stężenie rozpuszczonego tlenu w każdym naczyniu. Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 60 % wartości nasycenia powietrzem (ASV) w wybranej temperaturze, a wartość pH w warstwie wody powyżej osadu powinna we wszystkich naczyniach używanych do badania znajdować się w przedziale 6–9,

▼M4

— temperatura wody nie powinna różnić się o więcej niż ± 1,0 °C. Temperaturę wody można kontrolować przy użyciu pomieszczenia izotermicznego i w takim przypadku temperatura pomieszczenia powinna być potwierdzana w stosownych odstępach czasowych.

OPIS METODY

Naczynia używane do badania

11. Badanie prowadzone jest w szklanych zlewkach o pojemności 600 ml i średnicy 8 cm. Inne naczynia także mogą nadawać się do badania, powinny jednak zapewniać odpowiednią głębokość warstwy osadu i warstwy wody powyżej. Powierzchnia osadu powinna być wystarczająca, by zapewnić od 2 do 3 cm^2 na larwę. Stosunek głębokości warstwy osadu do warstwy wody powyżej powinien wynosić 1:4. Naczynia do badania i inne przyrządy mające kontakt z układem badawczym powinny być w całości wykonane ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału (np. teflonu).

Wybór gatunków

12. Gatunkiem wykorzystywanym w badaniu powinien być w miarę możliwości *Chironomus riparius*. Odpowiedni jest także *Chironomus tentans*, ale jest trudniejszy w hodowli i wymaga dłuższego okresu badania. Można także korzystać z *Chironomus yohimatsui*. Szczegóły metod hodowli dla *Chironomus riparius* podano w dodatku 2. Informacje dotyczące warunków hodowli są także dostępne dla innych gatunków, tj. *Chironomus tentans* (4) i *Chironomus yoshimatsui* (11). Przed przeprowadzeniem badania należy potwierdzić identyfikację gatunków, ale nie jest to wymagane przed każdym badaniem, jeśli organizmy pochodzą z hodowli wewnątrzlaboratoryjnej.

Osad

13. W miarę możliwości należy stosować osad preparowany (zwany także osadem regenerowanym, sztucznym lub syntetycznym). Jeśli jednak korzysta się z osadu naturalnego, należy go scharakteryzować (co najmniej pod kątem pH, zawartości węgla organicznego, zaleca się także określenie innych parametrów, takich jak stosunek C/N i granulometria). Osad taki powinien być wolny od zanieczyszczeń i innych organizmów, które mogłyby konkurować z ochotkowatymi lub je zjadać. Zaleca się także, by przed jego wykorzystaniem w badaniu toksyczności dla ochotkowatych naturalny osad był przez siedem dni kondycjonowany w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania. Do wykorzystania w tym badaniu (1) (15) (16) zaleca się następujący osad preparowany oparty na sztucznej glebie stosowanej w metodzie badawczej C.8 (14):

a) torf 4–5 % (w przeliczeniu na suchą masę): wartość pH możliwie najbardziej zbliżona do przedziału 5,5 do 6,0; ważne jest, by stosować torf w postaci sproszkowanej, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 1 mm) i suszony wyłącznie powietrzem;

b) glinka kaolinowa 20 % (w przeliczeniu na suchą masę) (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);

c) piasek kwarcowy 75–76 % (w przeliczeniu na suchą masę) (powinien przeważać drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek mierzy od 50 do 200 μm);

d) dla uzyskania wilgotności końcowej mieszkanki na poziomie od 30-50 % dodaje się wodę dejonizowaną;

e) w celu skorygowania pH końcowej mieszanki osadu do wartości 7,0 ± 0,5 dodaje się do niej chemicznie czysty węglan wapnia ($CaCO_3$);

f) zawartość węgla organicznego w końcowej mieszance powinna wynosić 2 % (± 0,5 %) i należy ją skorygować przy użyciu odpowiednich ilości torfu i piasku, zgodnie z lit. a) i c).

▼M4

14. Źródło torfu, glinki kaolinowej i piasku powinno być znane. Składniki osadu należy sprawdzić pod kątem zanieczyszczenia chemicznego (np. metalami ciężkimi, związkami chloroorganicznymi, związkami fosforoorganicznymi itp.). W dodatku 3 podano przykładowy sposób przygotowania osadu preparowanego. Dopuszczalne jest także mieszanie suchych składników, o ile wykaże się, że po dodaniu warstwy wody powyżej osadu składniki osadu się nie rozdzielają (np. nie unoszą się cząstki torfu) oraz że torf lub osad jest poddawany dostatecznemu kondycjonowaniu.

Woda

15. Jako wodę do badania można stosować każdy rodzaj wody, której charakterystyka zgodna jest z charakterystyką chemiczną wody nadającej się do rozcieńczania, jak opisano w dodatkach 2 i 4. Do hodowli ochotkowatych i do badania może służyć każdy odpowiedni rodzaj wody, np. woda naturalna (powierzchniowa lub gruntowa), woda regenerowana (zob. dodatek 2) lub odchlorowana woda wodociągowa, pod warunkiem że ochotkowate przeżyją w niej przez okres hodowli i badania bez wykazywania oznak stresu. Na początku badania wartość pH wody do badania powinna wynosić od 6 do 9, a twardość ogółem wody w przeliczeniu na $CaCO_3$ nie powinna być wyższa niż 400 mg/l. Jeśli jednak podejrzewa się, że między jonami powodującymi twardość wody a substancją badaną dochodzi do interakcji, powinna być stosowana woda o mniejszej twardości (a zatem w takim przypadku nie wolno używać pożywki Elendta M4). Przez okres całego badania należy stosować ten sam rodzaj wody. Cechy jakości wody, wymienione w dodatku 4, należy mierzyć co najmniej dwa razy w roku lub ilekroć zachodzi podejrzenie, że mogły one ulec znacznej zmianie.

Roztwory podstawowe – woda wzbogacana

16. Badane stężenia oblicza się na podstawie stężeń w słupie wody, tj. w warstwie wody powyżej osadu. Roztwory testowe o wybranych stężeniach są zwykle przygotowywane przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Zalecane jest przygotowanie roztworów podstawowych przez rozpuszczenie substancji badanej w pożywce. W niektórych przypadkach wymagane może być stosowanie rozpuszczalników lub środków dyspergujących w celu uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Przykładami odpowiednich rozpuszczalników są aceton, etanol, metanol, eter monoetylowy glikolu etylenowego, eter dimetylowy glikolu etylenowego, dimetyloformamid i glikol trójetylenowy. Dopuszczalne środki dyspergujące to kremofor RH40, Tween 80, metyloceluloza 0,01 % i HCO-40. Stężenie środka rozpuszczającego w końcowej pożywce powinno być minimalne (tj. $\leq$ 0,1 ml/l) i jednakowe we wszystkich zabiegach. Gdy stosuje się środki rozpuszczające, nie mogą one mieć znaczącego wpływu na przeżycie ani widocznego szkodliwego działania na larwy ochotkowatych, wykazanego w doświadczeniu kontrolnym z rozpuszczalnikiem. Należy jednak dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć użycia takich substancji.

PROJEKT BADANIA

17. Projekt badania obejmuje dobór liczby badanych stężeń i ich zróżnicowanie, liczby naczyń zawierających dane stężenie substancji i liczby larw na jedno naczynie. Opisano projekty dotyczące punktowego oszacowania wartości EC, oszacowania wartości NOEC i przeprowadzenia badania granicznego. Zaleca się raczej analizę regresji niż podejście oparte na badaniu hipotez.

Projekt analizy regresyjnej

18. Stężenie efektywne (np. EC_{15}, EC_{50}) i zakres stężeń, powyżej którego skutki działania substancji badanej stają się przedmiotem zainteresowania, należy wyskalować z zastosowaniem stężeń ujętych w badaniu. Na ogół dokładność, a zwłaszcza ważność, z jakimi można dokonać oceny stężeń efektywnych (EC_x), są wyższe, gdy stężenie efektywne mieści się w zakresie badanych stężeń. Należy unikać ekstrapolowania wyników znacznie poniżej

▼M4

najniższego stężenia dającego wynik dodatni lub powyżej najwyższego stężenia. Wstępne badanie ustalające zakres jest pomocne przy wyborze zakresu stężeń do zastosowania (zob. pkt 27).

19. Jeśli trzeba oszacować EC_x, należy zbadać co najmniej pięć stężeń i trzy replikaty dla każdego stężenia. W każdym przypadku zaleca się stosowanie dostatecznych stężeń substancji badanej, aby umożliwić dobre oszacowanie parametrów modelu. Współczynnik odstępów między stężeniami nie powinien być większy niż dwa (z wyjątkiem przypadków, gdy krzywa dawka-odpowiedź ma łagodny przebieg). Liczba replikatów przy każdym podaniu dawki substancji badanej może być zmniejszona, jeśli zwiększy się liczbę stężeń substancji badanej dających różne odpowiedzi. Zwiększenie liczby replikatów lub zmniejszenie wielkości odstępów między badanymi stężeniami zwykle prowadzi do zwężenia przedziałów ufności dla danego badania. Jeśli celem jest oszacowanie przeżycia i wzrostu larw w okresie 10 dni, wymagane są dodatkowe replikaty.

Projekt dotyczący oszacowania NOEC/LOEC

20. Jeśli celem jest oszacowanie wartości LOEC/NOEC, należy zastosować pięć stężeń substancji badanej z co najmniej czterema replikatami, a współczynnik odstępów między stężeniami nie powinien być większy niż dwa. Liczba replikatów powinna być na tyle duża, by zapewnić odpowiednią moc statystyczną dla wykrycia 20 % różnicy z próbą kontrolną przy istotności wynoszącej 5 % (p = 0,05). W przypadku współczynnika rozwoju zwykle stosowna jest analiza wariancji (ANOVA), np. badanie Dunnetta i badanie Williamsa (17) (18) (19) (20). W przypadku współczynnika wylęgu można stosować test Cochrana-Armitage'a, test dokładny Fishera (z korektą Bonferroniego) lub test Mantela-Haenszela.

Badanie graniczne

21. Jeśli we wstępnym badaniu ustalającym zakres nie zaobserwowano żadnych zmian, można przeprowadzić badanie graniczne (jedno stężenie badane i jedna próba kontrolna). Celem badania granicznego jest pokazanie, że toksyczność substancji badanej jest większa niż zbadane stężenie graniczne. W ramach niniejszej metody badawczej nie można zaproponować zalecanego stężenia; kwestię tę pozostawia się uznaniu organów regulacyjnych. Zazwyczaj koniecznych jest co najmniej 6 replikatów zarówno dla próby poddawanej działaniu substancji, jak i dla próby kontrolnej. Należy wykazać odpowiednią moc statystyczną, która pozwala wykryć 20 % różnicę w porównaniu z próbą kontrolną przy 5 % poziomie istotności (p = 0,05). Przy odpowiedzi metrycznej (współczynnik rozwoju i masa) odpowiednią metodą statystyczną jest test t-Studenta, jeśli dane spełniają warunki tego testu (normalność rozkładu zmiennych, jednorodność wariancji). Jeśli te warunki nie są spełnione, można zastosować test t-Studenta dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, np. test Manna-Whitneya-Wilcoxona. W przypadku współczynnika wylęgu odpowiedni jest test dokładny Fishera.

PROCEDURA

Warunki narażenia na działanie substancji

Przygotowanie układu woda wzbogacona-osad

22. Do naczyń do badania dodaje się odpowiednie ilości preparowanego osadu (zob. pkt 13–14 oraz dodatek 3), aby powstała warstwa o grubości co najmniej 1,5 cm. Wodę dodaje się do głębokości 6 cm (zob. pkt 15). Stosunek głębokości warstwy osadu do warstwy wody nie powinien przekraczać 1:4, a warstwa osadu nie powinna być wyższa niż 3 cm. Przed dodaniem organizmów badanych układ osad-woda należy delikatnie napowietrzać przez siedem dni (zob. pkt 14 oraz dodatek 3). Podczas dodawania badanej wody do słupa wody nad osadem, aby uniknąć oddzielenia składników osadu i ponownego zawieszenia w wodzie drobnoziarnistego materiału, osad na czas zalewania można nakryć plastikowym krążkiem, a krążek następnie od razu usunąć. Właściwe może być także zastosowanie innych przyrządów.

▼M4

23. Naczynia do badania powinny być przykryte (np. szklanymi płytkami). W razie konieczności w czasie badania poziom wody uzupełnia się do pierwotnej objętości, aby wyrównać brak spowodowany jej parowaniem. Należy w tym celu używać wody destylowanej lub dejonizowanej, aby zapobiec odkładaniu się soli.

Dodanie organizmów badanych

24. Na cztery-pięć dni przed umieszczeniem organizmów badanych w naczyniach używanych do badania pakiety jaj należy wyjąć z hodowli i umieścić w małych naczyniach w pożywce hodowlanej. Można w tym celu zastosować pożywkę wykorzystywaną w hodowli podstawowej lub pożywkę świeżo przygotowaną. Jeśli stosowana jest ta ostatnia, do pożywki hodowlanej należy dodać niewielką ilość pokarmu, np. zielenice lub kilka kropel filtratu z drobno zmielonej zawiesiny pokarmu w płatkach dla ryb (zob. dodatek 2). Należy korzystać wyłącznie ze świeżo złożonych pakietów jaj. Wylęg larw zaczyna się przeważnie kilka dni po złożeniu pakietów jaj (2 do 3 dni w przypadku *Chironomus riparius* w temperaturze 20 °C oraz 1 do 4 dni w przypadku *Chironomus tentans* w temperaturze 23 °C i *Chironomus yoshimatsui* w temperaturze 25 °C), a wzrost larw następuje w czterech stadiach larwalnych, przy czym każde z nich trwa od 4 do 8 dni. Do badania należy stosować larwy w pierwszym stadium larwalnym (2–3 lub 1–4 dni po wylęgu). Stadium larwalne kuczmanów można sprawdzić, stosując pomiar szerokości puszki głowowej (6).

25. Dwadzieścia larw w pierwszym stadium larwalnym przydziela się losowo do każdego naczynia doświadczalnego zawierającego osad wzbogacony i wodę przy użyciu tępo zakończonej pipety. Po wprowadzeniu larw do naczyń należy zatrzymać napowietrzanie wody i nie uruchamiać go przez dobę po ich wprowadzeniu (zob. pkt 24 i 32). Zgodnie z zastosowanym projektem badania (zob. pkt 19 i 20) w celu oszacowania punktowego EC należy zastosować co najmniej 60 larw na stężenie, a w celu oznaczenia wartości NOEC – 80 larw.

26. Dwadzieścia cztery godziny po dodaniu larw słup wody powyżej osadu wzbogacany jest w substancję badaną i ponownie zapewniane jest delikatne napowietrzanie. Małe ilości roztworów substancji badanej wprowadza się pod powierzchnię wody za pomocą pipety. Wodę powyżej osadu należy następnie ostrożnie zamieszać, tak aby go nie poruszyć.

Badane stężenia

27. Badanie ustalające zakres może być przydatne do określenia zakresu stężeń dla ostatecznego badania. W tym celu stosuje się szereg roztworów o znacznie różniących się od siebie stężeniach substancji badanej. Aby zapewnić tę samą gęstość powierzchni na ochotkowate, co stosowana w ostatecznym badaniu, ochotkowate poddaje się narażeniu na każde stężenie substancji badanej przez okres pozwalający oszacować odpowiednie jej stężenie badane i nie wymagane są replikaty.

28. Decyzje dotyczące stężeń substancji badanej w ostatecznym badaniu podejmuje się w oparciu o wynik badania ustalającego zakres. Jak opisano w pkt 18 do 20, należy zastosować i wybrać co najmniej pięć stężeń.

Próby kontrolne

29. Naczynia zawierające próby kontrolne bez substancji badanej, ale zawierające osad, powinny być uwzględnione w badaniu z odpowiednią liczbą replikatów (zob. pkt 19 i 20). Jeśli do wprowadzenia substancji badanej został użyty rozpuszczalnik (zob. pkt 16), należy dodać próbę kontrolną zawierającą osad z rozpuszczalnikiem.

▼M4

Układ badawczy

30. Stosowane są układy statyczne. W wyjątkowych przypadkach, na przykład gdy określone w specyfikacjach cechy jakości wody staną się nieodpowiednie dla organizmu badanego lub naruszą równowagę chemiczną (np. poziomy rozpuszczonego tlenu spadną zbyt nisko, stężenie produktów wydalania za bardzo wzrośnie lub nastąpi uwalnianie minerałów z osadu, które wpłynie na wartość pH lub twardość wody), można stosować układy półstatyczne lub przepływowe z okresowym lub stałym odnawianiem wody powyżej osadu. Inne metody poprawy jakości wody powyżej osadu, np. napowietrzanie, zwykle jednak wystarczają i należy w miarę możliwości z nich korzystać.

Pokarm

31. Larwy trzeba karmić, w miarę możliwości codziennie lub co najmniej trzy razy w tygodniu. Odpowiedni do karmienia młodych larw przez pierwsze 10 dni wydaje się pokarm dla ryb (zawiesina w wodzie lub drobno zmielony pokarm, np. TetraMin lub TetraPhyll, zob. szczegółowe informacje w dodatku 2) w ilości 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg w przypadku *C. yoshimatsui*) na larwę dziennie. Starsze larwy mogą potrzebować nieco więcej pokarmu: 0,5–1 mg na larwę na dzień powinno być wystarczającą ilością przez pozostałą część badania. Jeśli obserwuje się wzrost grzybów lub śmiertelność w próbach kontrolnych, należy wówczas we wszystkich próbach kontrolnych i doświadczalnych ograniczyć i kontrolować racje żywieniowe. Jeśli nie można powstrzymać rozwoju grzybów, należy powtórzyć badanie. Przy badaniu substancji silnie adsorbujących (np. o log K_{ow} > 5) lub w przypadku substancji tworzących wiązanie kowalencyjne z osadem ilość pokarmu niezbędną do zapewnienia przeżycia i naturalnego wzrostu organizmów można dodać do osadu preparowanego przed okresem stabilizacji. W tym celu zamiast pokarmu dla ryb należy stosować surowiec roślinny, np. dodatek 0,5 % (w przeliczeniu na suchą masę) drobno zmielonych liści np. pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*), morwy białej (*Morus alba*), koniczyny białej (*Trifolium repens*), szpinaku (*Spinacia oleracea*), można też użyć innego surowca roślinnego (produktu *Cerophyl* lub alfa-celulozy).

Warunki inkubacji

32. W miarę możliwości w ciągu 24 godzin od wprowadzenia larw należy zapewnić delikatne napowietrzanie warstwy wody powyżej osadu w naczyniach do badania, a następnie kontynuować je przez cały okres badania (należy dopilnować, by stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadło poniżej 60 % ASV). Napowietrzanie prowadzone jest z użyciem szklanej pipety Pasteura przytwierdzonej 2–3 cm nad warstwą osadu (tj. w ilości jednego lub kilku bąbli powietrza/sek.). Przy badaniu lotnych chemikaliów można rozważyć nienapowietrzanie układu osad-woda.

33. Badanie przeprowadza się w stałej temperaturze 20 °C (± 2 °C). Zalecane temperatury w przypadku *C. tentans* i *C. yoshimatsui* to odpowiednio 23 °C i 25 °C (± 2 °C). Stosuje się 16-godzinny fotoperiod, a natężenie światła powinno wynosić od 500 do 1 000 luksów.

Czas trwania narażenia

34. Czas trwania narażenia rozpoczyna się od wprowadzenia larw do naczyń z próbą wzbogaconą i naczyń zawierających próby kontrolne. Maksymalny czas trwania narażenia wynosi 28 dni w przypadku *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a w przypadku *C. tentans* 65 dni. Jeśli kuczmany wylęgną się wcześniej, badanie można zakończyć po co najmniej pięciu dniach od wylęgu ostatniego dorosłego osobnika w próbie kontrolnej.

OBSERWACJE

Wylęg osobników dorosłych

35. Należy określić czas rozwoju i całkowitą liczbę w pełni wylęgniętych samców i samic kuczmanów. Samce łatwo zidentyfikować dzięki ich pierzastym czułkom.

▼M4

36. Naczynia do badania należy obserwować co najmniej trzy razy w tygodniu w celu wzrokowej oceny ewentualnego nieprawidłowego zachowania (np. porzucanie osadu, nietypowy sposób pływania) w porównaniu z próbą kontrolną. W okresie spodziewanego wylęgu kuczmanów konieczne jest codzienne ich zliczanie. Płeć i liczbę w pełni wylęgniętych kuczmanów należy zapisywać codziennie. Po identyfikacji kuczmany usuwane są z naczyń. Pakiety jaj złożone przed zakończeniem badania należy odnotować, a następnie usunąć, by zapobiec ponownemu wprowadzeniu larw do osadu. Należy także odnotować liczbę widocznych poczwarek, z których nie wylęgły się kuczmany. Wytyczne dotyczące pomiaru wylęgu zawarte są w dodatku 5.

Wzrost i przeżycie

37. Jeśli mają być dostarczone dane dotyczące 10-dniowego przeżycia i wzrostu larw, należy na początku włączyć do badania dodatkowe naczynia, by mogły być w tym celu wykorzystane. Aby zebrać larwy, osad z tych dodatkowych naczyń należy przesiać, używając sita 250 μm. Kryteriami zgonu są nieruchomość lub brak reakcji na bodziec mechaniczny. Larwy nieodzyskane należy także liczyć jako martwe (larwy, które padły na początku badania, mogły zostać rozłożone przez drobnoustroje). Należy określić suchą masę (bez popiołu) larw pozostałych przy życiu na każde naczynie do badania i obliczyć średnią suchą masę pojedynczej larwy na każde naczynie. Przydatne jest określenie, w którym stadium larwalnym znajdują się larwy pozostałe przy życiu; w tym celu można stosować pomiar puszki głowowej każdego osobnika.

Pomiary analityczne

Stężenie substancji badanej

38. Na początku i na końcu badania trzeba przeanalizować co najmniej próbki wody z warstwy powyżej osadu, wody porowej i osadu (najlepiej godzinę po wprowadzeniu substancji badanej), przy najwyższym stężeniu i przy niższym stężeniu. Takie oznaczenie stężenia substancji badanej daje wiedzę na temat zachowania/podziału substancji badanej w układzie woda-osad. Pobieranie próbek osadu na początku badania może wpływać na układ badawczy (np. poprzez usunięcie badanych larw), a zatem do wykonywania oznaczeń analitycznych na początku i w trakcie badania należy w stosownych przypadkach używać dodatkowych naczyń do badania (zob. pkt 39). Pomiary osadu mogą nie być konieczne, jeśli podział substancji badanej między wodą i osadem został wyraźnie określony w badaniu wody/osadu w porównywalnych warunkach (np. stosunek osadu do wody, rodzaj zastosowania, zawartość węgla organicznego w osadzie).

39. Gdy dokonuje się pomiarów pośrednich (np. w 7. dniu) lub jeśli do analizy potrzeba dużych próbek, których nie można pobrać z naczyń do badania bez wpływania na układ badawczy, należy dokonać oznaczeń analitycznych na próbkach pochodzących z dodatkowych naczyń do badania przygotowanych w ten sam sposób (zawierających także organizmy badane), ale nie wykorzystywanych do obserwacji biologicznych.

40. Aby oddzielić wodę porową, zaleca się odwirowanie osadu np. przy 10 000 g w temp. 4 °C przez 30 min. Jeśli jednak substancja badana nie adsorbuje się na filtrze, dopuszczalna jest też filtracja. W niektórych przypadkach zanalizowanie stężeń w wodzie porowej może nie być możliwe, ponieważ wielkość próbki jest zbyt mała.

▼M4

Parametry fizykochemiczne

41. Wartość pH, stężenie rozpuszczonego tlenu w wodzie do badania i temperatura w naczyniach do badania powinny być odpowiednio mierzone (zob. pkt 10). Twardość i zawartość amoniaku należy zmierzyć w próbach kontrolnych i w jednym naczyniu do badania przy najwyższym stężeniu na początku i na końcu badania.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

42. Celem badania jest określenie wpływu substancji badanej na współczynnik rozwoju i całkowitą liczbę w pełni wylęgniętych samic i samców kuczmanów lub, w przypadku badań 10-dniowych, skutków dla przeżycia i masy larw. Jeśli nie ma wskazań dotyczących statystycznie istotnych różnic we wrażliwości osobników każdej płci, wyniki dotyczące osobników męskich i żeńskich mogą zostać połączone do celów analizy statystycznej. Różnice we wrażliwości między płciami można oszacować statystycznie z wykorzystaniem np. tablicy rozkładu chi-kwadrat χ^2-r x 2. W razie konieczności przeżycie larw i średnią suchą masę larwy na naczynie należy określić po 10 dniach.

43. Wartości stężeń powodujące zmiany, wyrażone jako stężenia w wodzie powyżej osadu, należy obliczyć w miarę możliwości w oparciu o zmierzone stężenia na początku badania (zob. pkt 38).

44. Aby obliczyć oszacowanie punktowe dla EC_{50} i innych EC_x, jako prawdziwe replikaty można wykorzystywać dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyń. Przy wyliczaniu przedziału ufności dla EC_x należy uwzględnić zmienność między naczyniami lub należy wykazać, że zmienność ta jest tak niewielka, że można ją pominąć. Jeżeli model został dopasowany przy użyciu metody najmniejszych kwadratów, do danych statystycznych dotyczących poszczególnych naczyń należy zastosować przekształcenie, aby poprawić jednorodność wariancji. Wartości EC_x należy jednak liczyć po przekształceniu odpowiedzi z powrotem do wartości pierwotnej.

45. W przypadku gdy analiza statystyczna ma na celu określenie wartości NOEC/LOEC przez zastosowanie badania hipotezy statystycznej, należy wziąć pod uwagę zmienność między naczyniami, np. przez zastosowanie zagnieżdżonej analizy wariancji. Ewentualnie w przypadkach, w których występują naruszenia zwykłych założeń analizy wariancji, odpowiednie mogą być bardziej odporne testy (21).

Współczynnik wylęgu

46. W przypadku gdy oczekuje się monotonicznej zależności dawka-odpowiedź, a dane te są spójne z tym oczekiwaniem, współczynniki wylęgu, które są danymi dwuwartościowymi, można zanalizować z użyciem testu Cochrana-Armitage'a stosowanego na zasadzie krokowej wstecznej. W innym przypadku można zastosować test dokładny Fishera lub test Mantela-Haenszela z granicznym poziomem istotności skorygowanym metodą Bonferroniego-Holma. Jeśli są dowody na większą zmienność między replikatami w ramach tego samego stężenia niż wskazywałby na to rozkład dwumianowy (co określa się często jako zmienność większą niż zmienność w rozkładzie dwumianowym), wówczas należy zastosować odporny test Cochrana-Armitage'a lub test dokładny Fishera, tak jak proponuje się w pozycji (21) w bibliografii.

47. Suma kuczmanów wylęgniętych na każde naczynie, n_e, jest określana i dzielona przez liczbę wprowadzonych larw, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

gdzie:

ER = współczynnik wylęgu,

n_e = liczba wylęgniętych kuczmanów na każde naczynie,

n_a = liczba wprowadzonych larw na każde naczynie.

48. Najwłaściwszą alternatywą w przypadku dużych próbek, w których występuje wariancja większa niż wariancja w rozkładzie dwumianowym, jest traktowanie współczynnika wylęgu jako odpowiedzi ciągłej i stosowanie takich procedur jak test Williamsa, gdy oczekuje się monotonicznej zależności dawka-odpowiedź i oczekiwanie to jest zgodne z danymi dotyczącymi współczynnika wylęgu. Jeśli założenie dotyczące monotoniczności nie jest spełnione, odpowiedni byłby test Dunnetta. Uznaje się, że próbka jest duża, gdy zarówno liczba wylęgniętych kuczmanów, jak i liczba larw, z których się one nie wylęgły, przekracza pięć na każde naczynie stanowiące replikat.

49. Aby zastosować metody analizy wariancji, wartości współczynnika wylęgu należy najpierw przekształcić, stosując przekształcenie pierwiastkowe i arcsin lub przekształcenie Freemana-Tukeya w celu otrzymania przybliżonego normalnego rozkładu i wyrównania wariancji. Przy użyciu częstości bezwzględnej można zastosować test Cochrana-Armitage'a, test dokładny Fishera (z korektą Bonferroniego) lub test Mantela-Haenszela. Przekształcenie pierwiastkowe i arcsin stosuje się przez wyznaczenie funkcji odwrotnej względem sinusa ($\sin^{-1}$) pierwiastka współczynnika wylęgu.

50. W przypadku współczynników wylęgu wartości EC_x oblicza się, stosując analizę regresji (lub np. analizę probitową (22), logitową, analizę Weibulla, odpowiednie oprogramowanie komercyjne itd.).Jeśli analiza regresji zawodzi (np. w przypadku gdy występują mniej niż dwie częściowe odpowiedzi), stosuje się inne metody nieparametryczne, takie jak średnia krocząca lub prosta interpolacja.

Współczynnik rozwoju

51. Średnia czasu rozwoju to średni czas od wprowadzenia larw (dzień 0 badania) do wylęgu kuczmanów tworzących kohortę badaną (w celu policzenia rzeczywistego czasu rozwoju należy uwzględnić wiek larw w chwili wprowadzenia). Współczynnik rozwoju stanowi odwrotność czasu rozwoju (jednostka: 1/dzień) i przedstawia tę część rozwoju larwy, która następuje każdego dnia. Do celów oceny omawianych badań dotyczących toksyczności w osadzie preferowany jest współczynnik rozwoju, jako że jego wariancja jest mniejsza, jest bardziej jednorodny i bliższy normalnemu rozkładowi w porównaniu z czasem rozwoju. Dlatego silne metody parametryczne badania stosować można raczej w odniesieniu do współczynnika rozwoju niż do czasu rozwoju. Dla współczynnika rozwoju jako odpowiedzi ciągłej można szacować wartości EC_x, stosując analizę regresji (zob. np. (23) (24)).

52. Do celów poniższych badań statystycznych przyjmuje się, że liczba kuczmanów zaobserwowanych w dniu kontroli x wylęgła się w średniej arytmetycznej odstępu czasu między dniem x a dniem x-l (1 = długość odstępu czasowego między kontrolami, zwykle 1 dzień). Średnia arytmetyczna współczynnika rozwoju na każde naczynie (*x*) liczona jest według następującego wzoru:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

gdzie:

$\bar{x}$: średnia arytmetyczna współczynnika rozwoju na każde naczynie,

i: wskaźnik odstępu czasowego między kontrolami,

m: maksymalna liczba odstępów czasowych między kontrolami,

▼M4

f_i: liczba kuczmanów wylęgniętych w odstępie czasowym między kontrolami i,

n_e: całkowita liczba kuczmanów wylęgniętych na koniec doświadczenia, $(= \sum f_i)$

x_i: współczynnik rozwoju kuczmanów wylęgniętych w odstępie czasowym między kontrolami i.

$$x_i = 1 / \left(day_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

gdzie:

day_i: dzień kontroli (dni od wprowadzenia),

l_i: długość odstępu czasowego między kontrolami i (w dniach, zwykle 1 dzień).

Sprawozdanie z badania

53. Sprawozdanie z badania musi zawierać co najmniej następujące informacje:

Substancja badana

— cechy fizyczne i w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (rozpuszczalność w wodzie, prężność par, współczynnik podziału w glebie (lub w osadzie, jeśli jest dostępny), stabilność w wodzie itd.),

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej (nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna, numer CAS, wzór strukturalny), w tym czystość i metoda analityczna oznaczania ilościowego substancji badanej.

Badany gatunek

— zwierzęta wykorzystane w badaniu: gatunek, nazwa naukowa, źródło organizmów i warunki hodowli,

— informacje dotyczące postępowania z pakietami jaj i larwami,

— wiek zwierząt badanych w chwili umieszczenia w naczyniu do badania.

Warunki badania

— użyty osad, tj. osad naturalny lub preparowany,

— w przypadku osadu naturalnego – lokalizacja i opis miejsca pobrania próbki osadu, w tym, jeśli to możliwe, historia zanieczyszczenia; charakterystyka: pH, zawartość węgla organicznego, stosunek C/N i granulometria (w stosownych przypadkach),

— przygotowanie osadu preparowanego: składniki i charakterystyka (zawartość węgla organicznego, pH, wilgotność itd. na początku badania),

— przygotowanie wody do badania (jeśli stosowana jest woda regenerowana) i jej charakterystyka (stężenie tlenu, pH, przewodność właściwa, twardość itd. na początku badania),

— głębokość warstwy osadu i warstwy wody powyżej,

— objętość warstwy wody powyżej osadu i wody porowej; masa mokrego osadu z wodą porową i bez niej,

— naczynia do badania (materiał i wielkość),

— metody przygotowania roztworu podstawowego i badanych stężeń,

▼M4

— wprowadzenie substancji badanej: użyte stężeni, liczba replikatów i użyty rozpuszczalnik, jeśli go zastosowano,

— warunki inkubacji: temperatura, cykl i natężenie oświetlenia, napowietrzanie (częstotliwość i natężenie),

— szczegółowe informacje o żywieniu, w tym rodzaj pokarmu, przygotowanie, schemat żywienia i ilość pokarmu.

Wyniki

— nominalne stężenia badane, zmierzone stężenia badane i wyniki wszystkich analiz ustalających stężenia substancji badanej w naczyniach do badań,

— jakość wody w naczyniach do badania, tj. pH, temperatura, rozpuszczony tlen, twardość i zawartość amoniaku,

— uzupełnienie wyparowanej wody do badania, jeśli nastąpiło,

— liczbę wylęgniętych męskich i żeńskich kuczmanów na każde naczynie na każdy dzień,

— liczba larw, z których nie wylęgły się kuczmany, na każde naczynie,

— w stosownych przypadkach średnia sucha masa larw na każde naczynie do badania i na każde stadium larwalne,

— odsetek wylęgniętych kuczmanów na każdy replikat i na każde stężenie substancji badanej (samice i samce kuczmanów łącznie),

— średni współczynnik rozwoju w pełni wylęgniętych kuczmanów na każdy replikat i współczynnik poddania działaniu substancji badanej (samice i samce kuczmanów łącznie),

— oszacowania toksycznych punktów końcowych, np. EC_x (i powiązane przedziały ufności), wartość stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub najniższe stężenie, przy którym obserwuje się szkodliwe zmiany (LOEC) oraz metody statystyczne użyte w celu ich określenia,

— omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. M. Streloke i H. Köpp (red.). Berlin 1995.

(2) Fleming R i in. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Sprawozdanie końcowe dla Komisji Europejskiej. Nr sprawozdania: EC 3738. Sierpień 1994. WRc, Zjednoczone Królestwo.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Materiały z warsztatów WOSTA zorganizowanych w Niedrlandach.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. 1125–1241. W: ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Tom 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. Sprawozdanie SPE 1/RM/32. Grudzień 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Wyd. drugie. EPA 600/R-99/064. Marzec 2000. Zmiana wydania pierwszego z czerwca 1994 r.

▼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, Kanada.

(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 nr 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Sprawozdanie EPS 1/RM/30. Wrzesień 1995 r.

(14) Rozdział C.8 niniejszego załącznika. Toksyczność dla dżdżownic.

(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**

Dodatek 1

DEFINICJE

Dla celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Osad preparowany lub regenerowany, sztuczny lub syntetyczny stanowi mieszaninę materiałów używaną do naśladowania składników fizycznych naturalnego osadu.

Warstwa wody powyżej osadu to woda, którą zalano osad w naczyniu do badania.

Woda porowa to woda wypełniająca przestrzeń między cząstkami osadu i gleby.

Woda wzbogacona to woda do badania, do której dodano substancję badaną.

Badana substancja chemiczna: każda substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M4

Dodatek 2

Zalecenia dotyczące hodowli *Chironomus riparius*

1. Larwy ochotki (*Chironomus*) można hodować w naczyniach krystalizacyjnych lub większych zbiornikach. Na dnie zbiornika rozprowadza się drobny piasek kwarcowy, tworząc cienką warstwę grubości od 5 do 10 mm. Odpowiednim substratem okazała się także ziemia okrzemkowa (np. Merck, Art 8117), w przypadku której wystarczająca jest cieńsza warstwa grubości najwyżej kilku milimetrów. Następnie dodaje się odpowiednią wodę na głębokość kilku centymetrów. Poziomy wody należy uzupełniać, aby wyrównać stratę spowodowaną parowaniem i zapobiec wysychaniu. Wodę w razie konieczności można zastępować. Należy zapewnić delikatne napowietrzanie. Naczynia do chowu larw należy przechowywać w odpowiedniej klatce, aby zapobiec ucieczce wylęgniętych osobników dorosłych. Klatka powinna być na tyle duża, by umożliwić rojenie wylęgniętych osobników dorosłych, inaczej może nie dojść do kopulacji (co najmniej ok. 30 × 30 × 30 cm).

2. Klatki powinny być trzymane w temperaturze pokojowej lub w pomieszczeniu o stałych warunkach środowiska w temperaturze 20 ± 2 °C z fotoperiodem wynoszącym 16 godzin światła (o natężeniu ok. 1 000 luksów) i 8 godzin ciemności. Odnotowywano, że wilgotność powietrza mniejsza niż 60 % RH może przeszkodzić rozmnażaniu.

Woda do rozcieńczania

3. Można stosować każdy rodzaj wody naturalnej lub syntetycznej. Powszechnie stosowana jest woda gruntowa, odchlorowana woda wodociągowa i sztuczne pożywki (np. pożywka Elendta „M4” lub „M7”, zob. także poniżej). Woda przed użyciem powinna być napowietrzona. W miarę potrzeby woda do hodowli może być odnawiana przez ostrożne odlewanie lub wypłukiwanie zużytej wody z naczyń hodowlanych bez niszczenia oprzędów larw.

Karmienie larw

4. Larwy *Chironomus* należy karmić pokarmem w płatkach dla ryb (Tetra Min®, Tetra Phyll® lub innej marki pokarmem dla ryb) w ilości ok. 250 mg na każde naczynie na dzień. Można go podawać w postaci suchego mielonego proszku lub jako zawiesinę w wodzie: 1 g pokarmu w płatkach dodaje się do 20 ml wody do rozcieńczenia i rozdrabnia się do uzyskania jednorodnej mieszanki. Preparat ten można stosować jako pokarm w ilości ok. 5 ml na każde naczynie na dzień (przed użyciem wstrząsnąć). Starsze larwy mogą dostawać go więcej.

5. Żywienie dostosowuje się do jakości wody. Jeśli pożywka do hodowli staje się mętna, należy ograniczyć karmienie. Podawanie pokarmu należy starannie monitorować. Zbyt mała ilość pożywienia spowoduje migrację larw w kierunku słupa wody, a zbyt duża wywoła zwiększoną aktywność drobnoustrojów i zmniejszone stężenie tlenu. Oba rodzaje warunków mogą spowodować ograniczenie współczynnika wzrostu.

6. Przy przygotowywaniu nowych naczyń do hodowli można też dodać komórki niektórych gatunków zielenic (np. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Karmienie wylęgniętych osobników dorosłych

7. Niektórzy badacze sugerują, by do karmienia wylęgniętych osobników dorosłych używać tamponu z wełny bawełnianej nasączonego nasyconym roztworem sacharozy.

▼M4

Wylęg osobników dorosłych

8. Przy temperaturze 20 ± 2 °C po ok. 13–15 dniach w naczyniach do hodowli z larw wylęgną się osobniki dorosłe. Samce łatwo zidentyfikować dzięki pierzastym czułkom.

Pakiety jaj

9. Po tym, jak osobniki dorosłe pojawią się w klatce hodowlanej, należy trzy razy w tygodniu sprawdzać we wszystkich naczyniach do chowu larw, czy nie zostały złożone galaretowate pakiety jaj. Jeśli tak, należy je ostrożnie usunąć, a następnie przenieść do niewielkiego naczynia zawierającego próbkę wody używanej do hodowli. Pakiety jaj wykorzystuje się do zapoczątkowania hodowli w nowym naczyniu (np. 2–4 pakietów jaj na naczynie) lub do badań toksyczności.

10. Larwy w pierwszym stadium larwalnym powinny wylęgnąć się po 2–3 dniach.

Przygotowanie hodowli w nowych naczyniach

11. Po tym, jak hodowle zostaną założone, powinno być możliwe przygotowanie nowej hodowli larw w świeżym naczyniu raz na tydzień lub rzadziej, w zależności od wymogów badania, przy czym starsze naczynia po wylęgnięciu się w nich dorosłych kuczmanów się usuwa. Stosując ten układ, uzyskuje się stałą podaż dorosłych osobników przy zminimalizowaniu zarządzania.

Przygotowanie roztworów testowych „M4” i „M7”

12. Pożywka „M4” została opisana przez Elendta (1990). Pożywkę „M7” przygotowuje się jak pożywkę „M4”, z wyjątkiem substancji wskazanych w tabeli 1, których stężenie w „M7” jest czterokrotnie mniejsze niż w „M4”. Publikacja na temat pożywki „M7” znajduje się w przygotowaniu (Elendt, informacje własne). Roztwór testowy nie powinien być przygotowywany zgodnie z instrukcjami Elendta i Biasa (1990), ponieważ stężenia $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 oraz K_2HPO_4 podane dla przygotowania roztworów podstawowych nie są odpowiednie.

Przygotowanie pożywki „M7”

13. Każdy roztwór podstawowy (I) przygotowuje się oddzielnie, a z roztworów podstawowych (I) przygotowuje się łączony roztwór podstawowy (II) (zob. tabela 1). 50 ml łączonego roztworu podstawowego (II) oraz podane w tabeli 2 ilości każdego roztworu podstawowego makroskładnika odżywczego dopełnia się do 1 litra wodą dejonizowaną, aby przygotować pożywkę „M7”. Roztwór podstawowy witamin przygotowuje się przez dodanie trzech witamin do wody dejonizowanej, jak wskazano w tabeli 3. Do końcowej pożywki „M7” na krótko przed użyciem dodaje się 0,1 ml łączonego roztworu podstawowego witamin (roztwór podstawowy witamin przechowuje się zamrożony w małych podwielokrotnościach). Pożywka jest napowietrzana i stabilizowana.

Tabela 1

Roztwory podstawowe pierwiastków śladowych w przypadku pożywek M4 i M7

Roztwory podstawowe (I)	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną	W celu przygotowania łączonego roztworu podstawowego (II): zmieszać następujące ilości (ml) roztworów podstawowych (I) i dopełnić do 1 litra wodą dejonizowaną		Końcowe stężenia w w roztworach testowych (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**

Roztwory podstawowe (I)	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną	W celu przygotowania łączonego roztworu podstawowego (II): zmieszać następujące ilości (ml) roztworów podstawowych (I) i dopełnić do 1 litra wodą dejonizowaną		Końcowe stężenia w w roztworach testowych (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
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Te substancje różnią się w przypadku M4 i M7, jak określono wyżej.
(2) Roztwory te są przygotowywane oddzielnie, następnie zlewane razem i niezwłocznie autoklawowane.

Tabela 2

Roztwory podstawowe makroskładników odżywczych w przypadku pożywek M4 i M7

	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną	Ilość (ml/l) roztworów podstawowych makroskładników odżywczych w celu przygotowania pożywek M4 i M7	Końcowe stężenia (mg/l) w roztworach testowych pożywek M4 i M7
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	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**

Tabela 3

Roztwór podstawowy witamin w przypadku pożywek M4 i M7

Ilość (ml/l) roztworu podstawowego witamin dodawanego w celu przygotowania pożywek M4 i M7

	Wszystkie trzy roztwory witamin łączy się, by otrzymać jeden roztwór podstawowy witamin.	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną	Końcowe stężenia (mg/l) w roztworach testowych pożywek M4 i M7
Hydrochlorek tiaminy	750	0,1	0,075
Cyjanokobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotyna	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAFIA

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. M. Streloke i H. Köpp (red.). Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt BP i 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

Dodatek 3

PRZYGOTOWANIE OSADU PREPAROWANEGO

Skład osadu

Skład osadu preparowanego powinien być następujący:

Składnik	Właściwości	% suchej masy osadu
Torf	Torf z rozkładu mchu torfowca (Sphagnum), w miarę możliwości o wartości pH równej 5,5–6,0, bez widocznych pozostałości roślin, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 1 mm), suszony powietrzem	4–5
Piasek kwarcowy	Wielkość ziaren: > 50 % cząstek powinna mieścić się w przedziale 50–200 μm.	75-76
Glinka kaolinowa	Zawartość kaolinitu ≥ 30 %	20
Węgiel organiczny	Skorygowana przez dodanie torfu i piasku	2 (±0,5)
Węglan wapnia	$CaCO_3$, sproszkowany, chemicznie czysty	0,05–0,1
Woda	Przewodność właściwa ≤ 10 μS/cm	30–50

Przygotowanie

Torf suszy się powietrzem i mieli na drobny proszek. Zawiesinę wymaganej ilości proszku torfowego w wodzie dejonizowanej przygotowuje się z użyciem wysokosprawnego urządzenia do homogenizacji. Wartość pH zawiesiny koryguje się z użyciem $CaCO_3$ do poziomu 5,5 ± 0,5. W celu ustabilizowania pH i komponentu mikrobiologicznego zawiesinę kondycjonuje się przez co najmniej dwa dni w temperaturze 20 ± 2 °C, delikatnie ją mieszając. Ponownie mierzy się pH, którego wartość powinna wynosić 6,0 ± 0,5. Następnie zawiesinę torfową miesza się z innymi składnikami (piaskiem i glinką kaolinową) oraz wodą dejonizowaną, aby otrzymać jednorodny osad z zawartością wody w przedziale 30–50 procent suchej masy osadu. Wartość pH końcowej mieszaniny ponownie mierzy się i koryguje w miarę potrzeby za pomocą $CaCO_3$ do poziomu 6,5 do 7,5. Próbki osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość węgla organicznego. Następnie przed ich wykorzystaniem w badaniu toksyczności dla ochotkowatych zaleca się, by osad preparowany kondycjonować przez siedem dni w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania.

Przechowywanie

Suche składniki do przygotowywania osadu sztucznego mogą być przechowywane w suchym i chłodnym miejscu w temperaturze pokojowej. Nie powinno się przechowywać (mokrego) osadu preparowanego przed jego użyciem w badaniu. Osad należy wykorzystać natychmiast po 7-dniowym okresie kondycjonowania, kończącym proces jego przygotowania.

BIBLIOGRAFIA:

Rozdział C.8 niniejszego załącznika. Toksyczność dla dżdżownic.

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**

Dodatek 4

Właściwości chemiczne dopuszczalnej wody do rozcieńczania

Substancja	Stężenia
Cząstki stałe	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 mg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 µg/l
Twardość w przeliczeniu na $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Chlor resztkowy	< 10 µg/l
Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych	< 50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych plus polichlorowanych bifenyli	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l

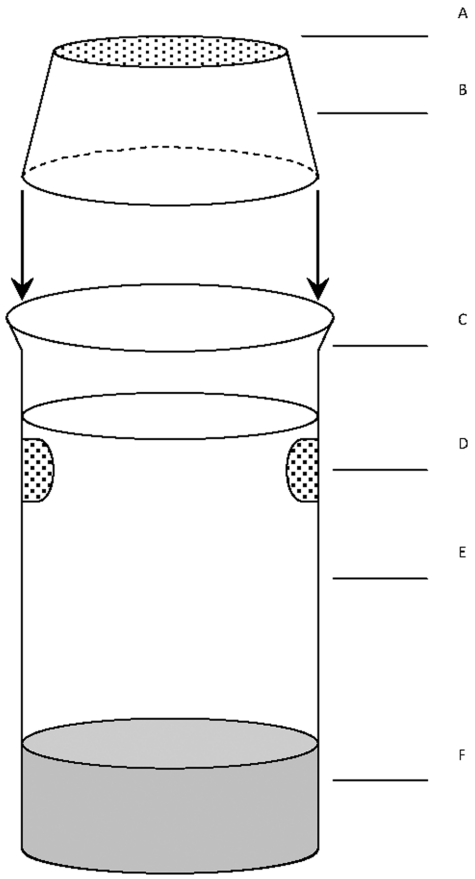
(*) Należy jednak pamiętać, że jeżeli podejrzewa się interakcję między jonami powodującymi twardość wody a substancją badaną, powinna być stosowana woda o mniejszej twardości (a zatem w takim przypadku nie wolno używać pożywki Elendta M4).

▼M4

Dodatek 5

Wytyczne dotyczące monitorowania wylęgu larw ochotkowatych

Na szklanych zlewkach do badania umieszczono pułapki na wylęgnięte kuczmany. Pułapki te potrzebne są od 20 dnia badania do zakończenia badania. Poniżej przedstawiono rysunek przedstawiający przykładową pułapkę:



A: siatka nylonowa

B: odwrócone kubeczki plastikowe

C: zlewka bez dzióbka do badania

D: osiatkowane otwory do wymiany wody

E: woda

F: osad

▼M4

C.29. **SZYBKA BIODEGRADOWALNOŚĆ – CO_2 W SZCZELNIE ZAMKNIĘTYCH NACZYNIACH (Badanie fazy gazowej nad roztworem)**

WSTĘP

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 310 (2006). Niniejsza metoda badawcza jest metodą przesiewową służącą do oceny szybkiej biodegradowalności chemikaliów, która dostarcza podobnych informacji, jak sześć metod badawczych A–F opisanych w rozdziale C.4 niniejszego załącznika. Zatem substancję chemiczną dającą dodatnie wyniki w niniejszej metodzie badawczej można uznać za ulegającą szybkiej biodegradacji, a co za tym idzie, ulegającą szybkiej degradacji w środowisku.

2. Ogólnie przyjętą metodę badania wydzielania się dwutlenku węgla (CO_2) (1), opartą na pierwotnym badaniu Sturma (2) służącym ocenie biodegradowalności organicznych substancji chemicznych w drodze pomiaru ilości dwutlenku węgla wytworzonego w wyniku aktywności mikrobiologicznej, wybierano zazwyczaj w pierwszej kolejności, by zbadać słabo rozpuszczalne chemikalia oraz te, które silnie adsorbują. Wybiera się ją także dla chemikaliów rozpuszczalnych (ale nie lotnych), ponieważ wielu uznaje wydzielanie się dwutlenku węgla za jedyny jednoznaczny dowód aktywności mikrobiologicznej. Usuwanie rozpuszczonego węgla organicznego można uzyskać w drodze procesów fizykochemicznych – adsorpcji, ulatniania się, strącania, hydrolizy – jak również aktywności mikrobiologicznej oraz wielu reakcji niebiologicznych, w których zużywany jest tlen; rzadko CO_2 powstaje z substancji organicznych w sposób abiotyczny. W pierwotnym i zmodyfikowanym badaniu Sturma (1) (2) CO_2 usuwa się z fazy ciekłej do naczyń absorbujących w drodze napowietrzania (tzn. przepuszczania powietrza poddawanego obróbce przez pożywkę ciekłą celem usunięcia CO_2), natomiast w wersji Larsona (3) (4) CO_2 przemieszcza się z naczynia reakcyjnego do absorberów dzięki przepuszczaniu powietrza wolnego od CO_2 przez fazę gazową nad roztworem i dodatkowo ciągłemu potrząsaniu naczyniem badawczym. Naczyniem reakcyjnym potrząsa się jedynie w modyfikacji Larsona; mieszanie jest przewidziane jedynie w przypadku substancji nierozpuszczalnych wymienionych w normie ISO 9439 (5) oraz w pierwotnej wersji amerykańskiej (6); w obu tych normach przewidziano napowietrzanie, a nie wymianę fazy gazowej nad roztworem. W innej oficjalnej metodzie amerykańskiej EPA (7), opartej na metodzie Gledhilla (8), potrząsane naczynie reakcyjne jest zamknięte dla atmosfery, a wytworzony CO_2 gromadzi się w wewnętrznej pułapce alkalicznej bezpośrednio z fazy gazowej, tak jak w klasycznych kolbach respirometrów Warburga/Barcrofta.

3. Wykazano jednak, że węgiel nieorganiczny (IC) kumuluje się w pożywce, gdy standardowe, zmodyfikowane badanie Sturma stosuje się do kilku chemikaliów (9). Stwierdzono stężenie węgla nieorganiczneog w wysokości nawet 8 mg/l w czasie rozkładu aniliny o zawartości 20 mg C/l. Zatem gromadzenie się CO_2 w pułapkach alkalicznych nie oddawało wiernie ilości CO_2 wyprodukowanego mikrobiologicznie w międzyczasie w trakcie rozkładu. W efekcie specyfikacja, zgodnie z którą, aby badana substancja chemiczna została sklasyfikowana jako ulegająca szybkiej biodegradacji, w ciągu 10-dniowego „okna” (10 dni bezpośrednio po osiągnięciu 10-procentowej biodegradacji) należy zebrać > 60 % teoretycznej maksymalnej ilości wytworzonego CO_2 ($ThCO_2$), nie zostanie spełniona dla niektórych chemikaliów, które zostałyby tak sklasyfikowane przy użyciu metody usuwania rozpuszczalnego węgla organicznego (DOC).

4. Jeśli wartość procentowego rozkładu jest mniejsza niż oczekiwana, węgiel nieorganiczny być może nagromadził się w badanym roztworze. Wówczas degradowalność można ocenić za pomocą innych badań na szybką biodegradowalność.

▼M4

5. Inne wady metodologii Sturma (która jest uciążliwa, czasochłonna, bardziej podatna na błędy doświadczalne i nie daje się zastosować do chemikaliów lotnych) już wcześniej spowodowały poszukiwania techniki z zastosowaniem szczelnie zamkniętych naczyń, innej niż metoda Gledhilla, zamiast metody przepływowo-gazowej (10) (11). Boatman i in. (12) dokonali przeglądu wcześniejszych metod i przyjęli system zamkniętej przestrzeni nad roztworem, w której CO_2 uwalniano do fazy gazowej nad roztworem pod koniec inkubacji poprzez zakwaszenie pożywki. CO_2 mierzono metodą chromatografii gazowej (GC)/analizy węgla nieorganicznego (IC) w automatycznie pobieranych próbkach fazy gazowej nad roztworem, jednak nie uwzględniono rozpuszczonego węgla nieorganicznego (DIC) w fazie ciekłej. Ponadto zastosowane naczynia były bardzo małe (20 ml) i zawierały jedynie 10 ml pożywki, co powodowało problemy np. przy dodawaniu z konieczności bardzo małych ilości nierozpuszczalnych badanych substancji chemicznych, a w zaszczepionej pożywce może być niewystarczająca ilość mikroorganizmów zdolnych do rozłożenia badanych substancji chemicznych lub też może ich nie być wcale.

6. Trudności te w niezależnych badaniach przezwyciężyli Struijs i Stoltenkamp (13) oraz Birch i Fletcher (14); drugie z tych badań było inspirowane doświadczeniem badaczy z aparaturą stosowaną w badaniu biodegradacji beztlenowej (15). W poprzedniej metodzie (13) CO_2 mierzy się w przestrzeni nad roztworem po zakwaszeniu i ustaleniu stanu równowagi, natomiast w drugiej (14) mierzono DIC zarówno w fazie gazowej, jak i w fazie ciekłej, bez dodawania substancji; ponad 90 % wytworzonego IC znajdowało się w fazie ciekłej. Obie metody posiadały zalety w porównaniu z badaniem Sturma: system badawczy był bardziej zwarty i łatwiejszy w obsłudze, umożliwia on badanie lotnych chemikaliów i możliwe jest uniknięcie opóźnienia w pomiarze wytworzonego CO_2.

7. Te dwa podejścia połączono w normie ISO dotyczącej oznaczania gazowego CO_2 nad roztworem (16), którą poddano badaniu międzylaboratoryjnemu (17) i to ta norma stanowi podstawę dla niniejszej metody badawczej. Podobnie te dwa podejścia zastosowano w metodzie amerykańskiej EPA (18). Zalecono dwie metody pomiaru CO_2, mianowicie CO_2 w fazie gazowej nad roztworem po zakwaszeniu (13) oraz IC w fazie ciekłej po dodaniu nadmiaru zasady. Drugą metodę wprowadził Peterson w czasie badania międzylaboratoryjnego CONCAWE (19) niniejszej metody pomiaru CO_2 w fazie gazowej nad roztworem, zmodyfikowanej dla celów pomiaru naturalnej podatności na biodegradację. W niniejszą metodę badawczą włączono zmiany wprowadzone w 1992 r. (20) w ramach rewizji metod opisanych w rozdziale C.4 niniejszego załącznika w odniesieniu do szybkiej biodegradowalności, tak że warunki (pożywka, czas trwania itp.) są poza tym takie same, jak zastosowane w poprawionym badaniu Sturma (20). Birch i Fletcher (14) wykazali, że przy pomocy niniejszej metody pomiaru CO_2 w fazie gazowej nad roztworem otrzymano bardzo podobne wyniki, jak w przypadku tych samych chemikaliów w badaniu międzylaboratoryjnym OECD (21) w odniesieniu do poprawionych metod badawczych.

ZASADA BADANIA

8. Badaną substancję chemiczną zawierającą zwykle 20 mg C/l, jako jedyne źródło węgla i energii inkubuje się w buforowej pożywce mineralnej, którą zaszczepiono mieszaną populacją mikroorganizmów. Badanie przeprowadza się w szczelnie zamkniętych butlach z powietrzem w fazie gazowej nad roztworem, co zapewnia zbiornik tlenu na potrzeby biodegradacji tlenowej. Wydzielanie się CO_2 wynikające z całkowitej biodegradacji tlenowej badanej substancji chemicznej określa się w drodze pomiaru ilości IC wytworzonego w badanych butlach przekraczającej ilość wytworzoną w naczyniach ślepej próby zawierających jedynie zaszczepioną pożywkę. Stopień biodegradacji wyraża się jako odsetek teoretycznej maksymalnej ilości wytworzonego IC (ThIC), w odniesieniu do ilości badanej substancji chemicznej (jak np. węgiel organiczny) dodanej na początku.

9. Możliwy jest również pomiar usuwania DOC lub stopnia pierwotnej biodegradacji badanej substancji chemicznej (20).

▼M4

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

10. Zawartość węgla organicznego (% w/w) badanej substancji chemicznej musi być znana z jej struktury chemicznej lub w wyniku pomiaru, tak by możliwe było obliczenie procentowego rozkładu. W przypadku lotnych badanych substancji chemicznych do określenia odpowiedniego stosunku objętości fazy gazowej nad roztworem do objętości cieczy pomocna jest zmierzona lub obliczona stała Henry'ego. Informacje na temat toksyczności badanej substancji chemicznej dla mikroorganizmów są przydatne przy wyborze odpowiedniego stężenia stosowanego w badaniu oraz przy interpretacji wyników wskazujących na słabą biodegradowalność: zaleca się uwzględnienie kontroli hamowania, chyba że wiadomo, że badana substancja chemiczna nie hamuje aktywności mikrobiologicznej (zob. pkt 24).

ZAKRES STOSOWANIA METODY

11. Badanie ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie, chociaż należy zapewnić dobrą dyspersję badanej substancji chemicznej. Stosując zalecany stosunek objętości fazy gazowej nad roztworem do objętości cieczy 1:2, można badać lotne chemikalia o stałej Henry'ego wynoszącej do 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$, gdyż proporcja badanej substancji chemicznej w przestrzeni nad roztworem nie przekroczy 1 % (13). Mniejszą objętość fazy gazowej nad roztworem można zastosować przy badaniu chemikaliów, które są bardziej lotne, ale ich biodostępność może być ograniczona, zwłaszcza jeśli są słabo rozpuszczalne w wodzie. Użytkownicy muszą jednak dopilnować, aby stosunek objętości fazy gazowej nad roztworem do objętości cieczy oraz stężenie badanej substancji chemicznej były takie, że dostępna będzie wystarczająca ilość tlenu, by możliwa była całkowita biodegradacja tlenowa (np. należy unikać wysokiego stężenia substratu i niewielkiej objętości przestrzeni nad roztworem). Wytyczne w tej kwestii można znaleźć w (13) (23).

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

12. Celem sprawdzenia procedury badania należy równolegle badać substancję odniesienia o znanej biodegradowalności. W tym celu można zastosować anilinę, benzoesan sodu lub glikol etylenowy przy badaniu rozpuszczalnych w wodzie badanych substancji chemicznych oraz 1-oktanol dla słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych (13). Biodegradacja tych chemikaliów musi wynieść > 60 % ThIC w ciągu 14 dni.

ODTWARZALNOŚĆ

13. W przewidzianym normą ISO badaniu międzylaboratoryjnym metody (17) uzyskano następujące rezultaty przy zastosowaniu zalecanych warunków, w tym badanej substancji chemicznej zawierającej 20 mg C/l.

Badana substancja chemiczna	Średnia biodegradacja procentowa (28d)	Współczynnik zmienności (%)	Liczba laboratoriów
Anilina	90	16	17
1-Oktanol	85	12	14

Zmienność wewnętrzna badania (odtwarzalność) przy zastosowaniu aniliny była niska, a współczynniki zmienności nie przekraczały 5 % w prawie wszystkich rundach badania. W dwóch przypadkach, w których odtwarzalność była gorsza, większa zmienność wynikała prawdopodobnie z dużej produkcji IC w ślepych próbach. Odtwarzalność była gorsza dla 1-oktanolu, jednak nadal wynosiła mniej niż 10 % dla 79 % rund badania. Ta większa zmienność wewnętrzna badania mogła wynikać z błędów w dozowaniu, gdyż trzeba było wstrzyknąć niewielką objętość (3 do 4 µl) 1-oktanolu do szczelnie zamkniętych badanych butli. Wyższe współczynniki zmienności otrzymano by przy zastosowaniu niższych stężeń badanych substancji chemicznych, zwłaszcza stężeń mniejszych niż 10 mg C/l. Można to częściowo przezwyciężyć, redukując stężenie całkowitego węgla nieorganicznego (TIC) w inokulum.

▼**M4**

14. W przeprowadzonym w UE badaniu międzylaboratoryjnym (24) pięciu środków powierzchniowo czynnych zawierających 10 mg C/l otrzymano następujące wyniki:

Badana substancja chemiczna	Średnia biodegradacja procentowa (28d)	Współczynnik zmienności (%)	Liczba laboratoriów
Sulfonian tetrapropylenobenzenu	17	45	10
Sulfobursztynian diizooktylu (anionowy)	72	22	9
Chlorek heksadecylotrimetylamoniowy (*) (kationowy)	75	13	10
Oksyetylenowany izononylofenol$_9$ (niejonowy)	41	32	10
Kokamidopropylo Dimetylohydroksy Sulfobetaina (amfoteryczna)	60	23	11

(*) Dodano SiO_2 celem neutralizacji toksyczności.

Wyniki pokazują, że na ogół zmienność była wyższa dla środków powierzchniowo czynnych słabiej ulegających rozkładowi. Zmienność wewnętrzna badania wynosiła mniej niż 15 % w ponad 90 % przypadków, przy czym najwyższa dochodziła do 30-40 %.

Uwaga: Większość środków powierzchniowo czynnych nie stanowi pojedynczych odmian cząsteczkowych, ale raczej mieszaniny izomerów, homologów itp., które ulegają rozkładowi po różnym charakterystycznym okresie opóźnienia i z inną szybkością, co skutkuje „niejasnymi”, osłabionymi krzywymi, tak że wartość progowa 60 % może nie zostać osiągnięta w 10-dniowym „oknie”, nawet jeśli każda z poszczególnych odmian cząsteczkowych poddana badaniu osobno osiągnęłaby wartość > 60 % w ciągu 10 dni. Można to zaobserwować także w przypadku innych złożonych mieszanin.

OPIS METODY

Urządzenia

15. Zwykłe urządzenia laboratoryjne oraz:

a) szklane butelki na osocze, szczelnie zamknięte korkami z kauczuku butylowego i zaciskanymi uszczelkami aluminiowymi. Zalecany rozmiar to „125 ml” o łącznej objętości ok. 160 ml (w tym przypadku objętość każdej butelki powinna być znana jako 160 ± 1 ml). Można użyć mniejszego naczynia, jeżeli wyniki spełniają warunki opisane w pkt 66 i 67;

b) analizator węgla lub inny przyrząd (np. chromatograf gazowy) do pomiarów węgla nieorganicznego;

▼M4

c) strzykawki o dużej precyzji do pobierania próbek gazowych i ciekłych;

d) wytrząsarka orbitalna w środowisku o kontrolowanej temperaturze;

e) Zaopatrzenie w powietrze wolne od CO_2 – można je przygotować przeprowadzając powietrze przez granule wapna sodowanego lub stosując mieszaninę gazową 80 % N_2/20 % O_2 (fakultatywnie) (zob. pkt 28);

f) membranowe urządzenie filtracyjne o porowatości 0,20–0,45 μm (fakultatywnie);

g) analizator węgla organicznego (fakultatywnie).

Odczynniki

16. W całym badaniu należy stosować odczynniki do analiz.

Woda

17. Należy stosować wodę destylowaną lub dejonizowaną, zawierającą ≤1 mg/l całkowitego węgla organicznego. Odpowiada to ≤ 5 % początkowej zawartości węgla organicznego wprowadzonej zalecaną dawką badanej substancji chemicznej.

Roztwory podstawowe na pożywkę mineralną

18. Roztwory podstawowe oraz pożywki mineralne są podobne do stosowanych w normie ISO 14593 (16) oraz w badaniach C.4 na „szybką biodegradowalność" (20). Zastosowanie większego stężenia chlorku amonu (2,0 g/l zamiast 0,5 g/l) powinno być konieczne jedynie w bardzo wyjątkowych przypadkach, np. kiedy stężenie badanej substancji chemicznej wynosi > 40 mg C/l. Roztwory podstawowe należy przechowywać w warunkach chłodniczych i usuwać po sześciu miesiącach lub wcześniej, jeśli wystąpią objawy strącania lub rozwoju mikroorganizmów. Należy przygotować następujące roztwory podstawowe:

a) diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4) 8,50 g

wodorofosforan potasu, (K_2HPO_4) 21,75 g

wodorofosforan sodu dwuwodny ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

chlorek amonu (NH_4Cl) 0,50 g

Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra. Wartość pH tego roztworu powinna wynosić 7,4 (± 0,2). Jeśli jest inaczej, należy przygotować nowy roztwór;

b) chlorek wapnia dwuwodny ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra;

c) siarczan magnezu siedmiowodny ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra;

d) chlorek żelaza(III) sześciowodny ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra oraz dodać jedną kroplę stężonego HCl.

Przygotowanie pożywki mineralnej

19. Zmieszać 10 ml roztworu a) z ok. 800 ml wody (pkt 17), następnie dodać 1 ml roztworów b), c) i d) i dopełnić wodą do 1 litra (pkt 17).

Inne odczynniki

20. Stężony kwas ortofosforowy (H_3PO_4) (> 85 % w/v).

▼M4

Roztwór 7M wodorotlenku sodu

21. Rozpuścić 280 g wodorotlenku sodu (NaOH) w 1 litrze wody (pkt 17). Określić stężenie DIC w tym roztworze i uwzględnić tę wartość przy obliczaniu wyników badania (zob. pkt 55 i 61), zwłaszcza w świetle kryterium ważności określonego w pkt 66 b). Przygotować nowy roztwór, jeśli stężenie DIC jest zbyt wysokie.

Badana substancja chemiczna

22. Przygotować roztwór podstawowy wystarczająco rozpuszczalnej w wodzie badanej substancji chemicznej w wodzie (pkt 17) lub w pożywce (pkt 19), najlepiej w stężeniu 100-krotnie większym niż ostateczne stężenie, które ma być zastosowane w badaniu; może być konieczne dostosowanie pH roztworu podstawowego. Roztwór podstawowy należy dodać do pożywki mineralnej, by uzyskać ostateczne stężenie węgla organicznego między 2 a 40 mg C/l, najlepiej 20 mg C/l. Jeśli zastosuje się stężenia mniejsze niż wymienione, uzyskana precyzja może ulec pogorszeniu. Rozpuszczalne i nierozpuszczalne chemikalia ciekłe można dodać bezpośrednio do naczyń za pomocą wysoce precyzyjnych strzykawek. Słabo rozpuszczalne i nierozpuszczalne badane substancje chemiczne mogą wymagać specjalnego podejścia (25). Do wyboru jest:

a) bezpośrednie dodanie znanych, zważonych ilości;

b) rozpraszanie ultradźwiękowe przed dodaniem;

c) dyspersja za pomocą środków emulgujących; wymagane jest określenie przed dodaniem, czy działają one hamująco, czy stymulująco na aktywność mikrobiologiczną;

d) adsorpcja ciekłych badanych substancji chemicznych lub rozpuszczenie w odpowiednim lotnym rozpuszczalniku, na obojętną pożywkę lub podłoże (np. filtr z włókna szklanego), następnie odparowanie rozpuszczalnika, jeśli został użyty, i bezpośrednie dodanie znanych ilości;

e) dodanie do pustego naczynia badawczego znanej objętości roztworu badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku łatwo przechodzącym w fazę lotną, a następnie odparowanie rozpuszczalnika.

Środki lub rozpuszczalniki użyte w lit. c), d) i e) należy zbadać pod kątem ewentualnego działania stymulującego lub hamującego dla aktywności mikrobiologicznej (zob. pkt 42b)).

Substancja odniesienia

23. Przygotować roztwór podstawowy (rozpuszczalnej) substancji odniesienia w wodzie (pkt 17), najlepiej w stężeniu 100-krotnie większym niż ostateczne stężenie, które ma być zastosowane (20 mg C/l) w badaniu.

Kontrola działania hamującego

24. Badane substancje chemiczne często nie wykazują istotnego rozkładu w warunkach stosowanych przy ocenianiu szybkiej biodegradowalności. Jedyną możliwą przyczyną jest to, że badana substancja chemiczna działa hamująco na inokulum w stężeniu, w którym jest stosowana w badaniu. Kontrolę działania hamującego można uwzględnić w projekcie badania celem ułatwienia identyfikacji (z perspektywy czasu) działania hamującego jako możliwej przyczyny lub czynnika przyczyniającego się do tego stanu rzeczy. Ewentualnie kontrola działania hamującego może wykluczyć takie interferencje i wykazać, że zerowy lub niewielki rozkład można przypisać jedynie brakowi podatności na działanie mikroorganizmów w warunkach, w których przeprowadza się badanie. Aby uzyskać informacje co do toksyczności badanej substancji chemicznej dla mikroorganizmów (tlenowych), należy przygotować roztwór w pożywce zawierający badaną substancję chemiczną i substancję odniesienia (pkt 19), każdą odpowiednio w tym samym stężeniu, w jakim jest dodawana (zob. ust 22 i 23).

▼M4

Inokulum

25. Inokulum można uzyskać z różnych źródeł: osad czynny; odpływ z oczyszczalni ścieków (niechlorowany); wody powierzchniowe i gleby; lub z mieszaniny tychże (20). Należy sprawdzić aktywność biodegradacyjną źródła poprzez zastosowanie substancji odniesienia. Niezależnie od źródła nie należy stosować mikroorganizmów wcześniej narażonych na badaną substancję chemiczną, jeśli procedura ma być stosowana do badania szybkiej biodegradowalności.

Ostrzeżenie: Osad czynny, ścieki i odpływ z oczyszczalni ścieków zawierają czynniki chorobotwórcze i należy obchodzić się z nimi ostrożnie.

26. Z doświadczenia wynika, że optymalna objętość inokulum to taka, która:

— jest wystarczająca, by dać odpowiednią aktywność biodegradacyjną,

— rozkłada substancję odniesienia w określonym procentowo stopniu (zob. pkt 66),

— daje od 10^2 do 10^5 jednostek tworzących kolonię na mililitr w mieszaninie końcowej,

— zazwyczaj daje stężenie 4 mg/l zawiesiny ciał stałych w mieszaninie końcowej w przypadku zastosowania osadu czynnego; możliwe jest użycie stężeń do 30 mg/l, jednak mogą one znacznie zwiększyć produkcję CO_2 naczyniach ślepej próby (26),

— wnosi mniej niż 10 % pierwotnego stężenia węgla organicznego, wprowadzanego przez badaną substancję chemiczną,

— wynosi na ogół 1-10 ml inokulum na 1 litr badanego roztworu.

Osad czynny

27. Świeżą próbkę osadu czynnego zbiera się z komory napowietrzania oczyszczalni ścieków lub urządzenia w skali laboratoryjnej, przerabiającego głównie ścieki domowe. W razie konieczności cząstki gruboziarniste należy usunąć w drodze odsiewania (np. stosując sito oczkowe o rozmiarze oczek 1 mm^2), a osad należy utrzymywać w warunkach tlenowych aż do chwili użycia.

28. Ewentualnie zsedymentować lub odwirować (np. przy 1 100 × g przez 10 minut) po usunięciu wszystkich cząstek gruboziarnistych. Odrzucić supernatant. Można przemyć osad w roztworze mineralnym. Zawiesić stężony osad w pożywce mineralnej dla uzyskania stężenia 3–5 g zawiesiny ciał stałych/l. Następnie napowietrzać do wymaganego momentu.

29. Osad należy pobrać z prawidłowo działającej konwencjonalnej oczyszczalni ścieków. Jeżeli osad trzeba pobrać z oczyszczalni o wysokiej szybkości oczyszczania lub podejrzewa się zawartość inhibitorów, należy go przemyć. Zsedymentować lub odwirować ponownie zawieszony osad po energicznym wymieszaniu, odrzucić supernatant i ponownie zawiesić przemyty osad w dalszej objętości pożywki mineralnej. Powtarzać tę procedurę do czasu, gdy uzna się, iż osad jest wolny od nadmiaru substratów lub inhibitorów.

30. Po osiągnięciu ponownego zawieszenia lub w przypadku osadu niepoddanego obróbce odstawić próbkę tuż przed jej użyciem celem ustalenia suchej masy ciał stałych w zawiesinie.

31. Inną możliwością jest homogenizacja osadu czynnego (3–5 g zawiesiny ciał stałych/l). Rozdrobnić osad w homogenizatorze Waringa przy średniej szybkości przez 2 minuty. Zsedymentować rozdrobniony osad przez 30 minut lub dłużej, w razie potrzeby, i zdekantować ciecz do użycia jako inokulum w ilości ok. 10 ml/l pożywki mineralnej.

▼M4

32. Jeszcze większą redukcję wydzielania CO_2 w ślepej próbie można osiągnąć napowietrzając osad w nocy powietrzem wolnym od CO_2. Jako stężenia inokulum w tym badaniu należy zastosować 4 mg/l ciał stałych z osadu czynnego (13).

Ścieki oczyszczone

33. Ewentualnie inokulum można uzyskać ze ścieków oczyszczonych z oczyszczalni ścieków lub urządzenia w skali laboratoryjnej przyjmującego głównie ścieki domowe. Należy utrzymywać próbkę w warunkach tlenowych i użyć w dniu pobrania lub w razie potrzeby wstępnie kondycjonować. Ścieki należy przefiltrować przez filtr gruboziarnisty celem usunięcia grubych cząstek stałych, a także zmierzyć wartość pH.

34. Celem zmniejszenia zawartości IC filtrat napowietrza się powietrzem wolnym od CO_2 (pkt 15-e) przez 1 godzinę, utrzymując pH na poziomie 6,5 za pomocą kwasu ortofosforowego (pkt 20). Wartość pH przywraca się do pierwotnego poziomu za pomocą wodorotlenku sodu (pkt 21), a po sedymentacji przez ok. 1 godzinę odpowiednią objętość supernatantu pobiera się do inokulacji. Wspomniana procedura napowietrzania zmniejsza zawartość IC w inokulum. Np. gdy jako inokulum zastosowano maksymalną zalecaną objętość przefiltrowancyh, napowietrzonych ścieków (100 ml) na litr, ilość IC obecnego w naczyniach kontrolnej ślepej próby kształtowała się w zakresie między 0,4 a 1,3 mg/l (14), co odpowiada 2–6,5 % C w badanej substancji chemicznej przy zawartości 20 mg C/l i 4–13 % przy zawartości 10 mg C/l.

Wody powierzchniowe

35. Pobiera się próbkę odpowiedniej wody powierzchniowej. Należy ją utrzymywać w warunkach tlenowych i użyć w dniu pobrania. Jeżeli to konieczne, należy zatężyć próbkę poprzez filtrację lub odwirowanie. Objętość inokulum do zastosowania w każdym z naczyń badawczych powinna spełniać kryteria podane w pkt 26.

Gleby

36. Pobiera się próbkę odpowiedniej gleby z głębokości do 20 cm poniżej powierzchni gleby. Kamienie, resztki roślin i bezkręgowce należy usunąć z próbki gleby przed przesianiem jej przez sito o oczkach 2 mm (jeśli próbka jest zbyt wilgotna, by można ją było przesiać natychmiast, wówczas należy częściowo wysuszyć ją powietrzem, aby ułatwić przesiewanie). Należy ją utrzymywać w warunkach tlenowych i użyć w dniu pobrania. (Jeśli próbka jest transportowana w luźno zawiązanej torbie polietylenowej, można ją przechowywać w torbie w temperaturze od 2 do 4 °C przez okres do jednego miesiąca).

Wstępne przygotowanie inokulum

37. Inokulum może być wstępnie kondycjonowane do warunków eksperymentalnych, lecz nie wstępnie adaptowane do badanej substancji chemicznej. Wstępne kondycjonowanie może zmniejszyć wydzielanie CO_2 w ślepej próbie. Wstępne kondycjonowanie obejmuje napowietrzanie osadu czynnego po rozpuszczeniu w pożywce do 30 mg/l wilgotnym powietrzem wolnym od CO_2 przez maksymalnie 5-7 dni w temperaturze badania.

PROCEDURA BADANIA

Liczba butli

38. Liczba butli (pkt 15-a) potrzebnych do badania będzie zależna od częstotliwości analizy i czasu trwania badania.

39. Zaleca się poddawanie analizie trzech butli w wystarczającej liczbie odstępów czasowych, tak aby można było zidentyfikować 10-dniowe okno. Na koniec badania analizuje się co najmniej pięć badanych butli (pkt 15-a) z zestawów a), b) i c) (zob. pkt 42), aby umożliwić obliczenie przedziałów ufności wynoszących 95 % w odniesieniu do średniej wartości procentowej biodegradacji.

▼M4

Zaszczepiona pożywka

40. Inokulum stosuje się w stężeniu 4 mg/l cząstek stałych osadu czynnego. Bezpośrednio przed użyciem należy przygotować wystarczającą ilość zaszczepionej pożywki poprzez dodanie na przykład 2 ml odpowiednio spreparowanego osadu czynnego (pkt 27-32) w dawce 2 000 mg/l do 1 litra pożywki mineralnej (pkt 19). W przypadku wykorzystania ścieków oczyszczonych należy dodać maksymalnie 100 ml odpływu (pkt 33) do 900 ml pożywki mineralnej (pkt 19) i rozcieńczyć pożywką do objętości 1 litra.

Przygotowanie butli

41. Podwielokrotności zaszczepionej pożywki rozdziela się do replikowanych butli, aby zapewnić stosunek objętości fazy gazowej nad roztworem do objętości cieczy wynoszący 1:2 (np. dodać 107 ml do butli o pojemności 160 ml). Można zastosować inne proporcje – zob. ostrzeżenie w pkt 11. Podczas korzystania z każdego rodzaju inokulum należy dopilnować, aby zaszczepiona pożywka była w wystarczającym stopniu wymieszana, co ma na celu zapewnienie równego rozdzielenia cieczy między butle do badania.

42. Przygotowuje się zestawy butli (pkt 15a) zawierające następujące elementy:

a) naczynia do badania (oznaczone jako F_T) zawierające badaną substancję chemiczną;

b) próby ślepe (oznaczone jako F_B) zawierające wyłącznie pożywkę do badania wraz z inokulum; należy również dodać wszelkie substancje chemiczne, rozpuszczalniki, środki lub filtry z włókna szklanego użyte do wprowadzenia badanej substancji chemicznej do naczynia do badania;

c) naczynia (oznaczone jako F_C) zawierające substancję odniesienia na potrzeby sprawdzenia procedury;

d) w razie potrzeby naczynia (oznaczone jako F_I) służące do sprawdzenia możliwych skutków hamujących badanej substancji chemicznej, zawierające zarówno badaną substancję chemiczną, jak i substancję odniesienia w takim samym stężeniu (pkt 24) jak odpowiednio w butlach F_T i F_C;

e) naczynia (oznaczone jako F_S) służące do sprawdzenia możliwego abiotycznego rozkładu jak a) plus 50 mg/l $HgCl_2$ lub wysterylizowane w inny sposób (np. poprzez autoklawowanie).

43. Rozpuszczalne w wodzie badane substancje chemiczne i substancje odniesienia dodaje się jako wodne roztwory podstawowe (pkt 22, 23 i 24), aby uzyskać stężenie wynoszące 10–20 mg C/l.

44. Nierozpuszczalne badane substancje chemiczne i nierozpuszczalne substancje odniesienia dodaje się do butli w różny sposób (zob. pkt 22a–e), w zależności od charakteru badanej substancji chemicznej, albo przed dodaniem zaszczepionej pożywki, albo później – zależnie od metody postępowania z badaną substancją chemiczną. W przypadku korzystania z jednej z procedur określonych w pkt 22a–e, butle na potrzeby ślepej próby F_B (pkt 42b) należy potraktować w podobny sposób, lecz z pominięciem badanej substancji chemicznej lub substancji odniesienia.

45. Lotne badane substancje chemiczne należy wstrzyknąć do szczelnie zamkniętych butli (pkt 47) za pomocą mikrostrzykawki. Dawkę oblicza się w oparciu o wstrzykniętą objętość oraz gęstość badanej substancji chemicznej.

46. W razie konieczności do naczyń należy dodać wody, aby uzyskać taką samą objętość cieczy w każdym naczyniu. Trzeba zagwarantować, że stosunek objętości fazy gazowej nad roztworem do objętości cieczy (zazwyczaj 1:2) i stężenie badanej substancji chemicznej były takie, by w fazie gazowej była dostępna wystarczająca ilość tlenu, aby umożliwić całkowitą biodegradację.

▼M4

47. Następnie wszystkie butle szczelnie się zamyka, na przykład przykrywką z kauczuku butylowego i aluminiową nakrętką. Lotne badane substancje chemiczne należy dodać na tym etapie (pkt 45). Jeżeli spadek stężenia rozpuszczalnego węgla organicznego w roztworze testowym ma być monitorowany, a analizy czasu zerowego mają być przeprowadzone dla wstępnego stężenia węgla nieorganicznego (sterylne kontrole, pkt 42) lub innych wyznaczników, należy odjąć odpowiednią próbkę z naczynia do badania. To naczynie do badania i jego zawartość następnie odrzuca się.

48. Szczelnie zamknięte butle umieszcza się na wytrząsarce obrotowej (pkt 15d), ustawiając wystarczającą szybkością wstrząsania, aby zawartość butli była dobrze wymieszana i utrzymywana w zawiesinie (np. 150-200 obr./min) i inkubuje w ciemności w temperaturze 20 °C, którą należy utrzymywać z maksymalnym odchyleniem ± 1 °C.

Pobieranie próbek

49. Schemat pobierania próbek będzie zależał od okresu zastoju i szybkości biodegradacji badanej substancji chemicznej w ujęciu kinetycznym. Butle są przeznaczane do analizy w dniu pobierania próbek, który powinien przypadać przynajmniej raz w tygodniu lub częściej (np. dwa razy w tygodniu), jeśli potrzebna jest pełna krzywa rozkładu. Wymaganą liczbę replikowanych butli, odpowiadających butlom F_T, F_B i F_C oraz F_I i F_S, jeżeli są używane, zabiera się z wytrząsarki (zob. pkt 42). Zazwyczaj badanie trwa 28 dni. Jeśli krzywa biodegradacji wskazuje na to, że plateau osiągnięto przed 28. dniem, wówczas badanie można zakończyć wcześniej niż 28. dnia. Należy pobrać próbki z pięciu butli przeznaczonych na 28. dzień badania do analizy i wykorzystać wyniki do obliczenia granic ufności lub współczynnika zmienności wartości procentowej biodegradacji. Z butli na potrzeby kontroli dotyczących hamowania i abiotycznego rozkładu nie trzeba pobierać próbek tak często jak z innych butli – wystarczy w 1. i 28. dniu.

Analiza węgla nieorganicznego

50. Wytwarzanie CO_2 w butlach określa się poprzez pomiar wzrostu stężenia węgla nieorganicznego podczas inkubacji. Istnieją dwie dostępne metody zalecane na potrzeby pomiaru ilości węgla nieorganicznego wytworzonej w ramach badaniu. Opisano je bezpośrednio poniżej. Ponieważ metody mogą dawać nieco odmienne wyniki, w jednej rundzie badania należy korzystać tylko z jednej z nich.

51. Metodę a) zaleca się, jeżeli pożywka może zawierać pozostałości np. bibuły filtracyjnej z włókna szklanego lub nierozpuszczalną badaną substancję chemiczną. Analizę tę można wykonać za pomocą chromatografu gazowego, jeżeli analizator węgla jest niedostępny. Ważne jest, aby podczas analizy gazu z fazy gazowej nad roztworem temperatura butli była równa temperaturze badania lub zbliżona do niej. Metoda b) może być łatwiejsza dla laboratoriów wykorzystujących do pomiaru węgla nieorganicznego analizatory węglowe. Ważne jest, aby roztwór wodorotlenku sodu (pkt 21) używany do przekształcenia CO_2 w węglan był świeżo przygotowany lub by jego zawartość węgla nieorganicznego była znana, tak aby można było uwzględnić go przy obliczaniu wyników badania (zob. pkt 66-b).

Metoda a): zakwaszenie do pH < 3

52. Przed rozpoczęciem każdej partii analiz analizator węgla nieorganicznego jest kalibrowany przy użyciu odpowiedniej normy dotyczącej węgla nieorganicznego (np. 1 % w/w CO_2 w N_2). Stężony kwas ortofosforowy (pkt 20) wstrzykuje się przez korek każdej butli, z których pobiera się próbki, aby obniżyć pH pożywki do < 3 (np. dodając 1 ml do 107 ml pożywki do badania). Butle ponownie umieszcza się w wytrząsarce. Po godzinie wytrząsania w temperaturze badania butle są usuwane z wytrząsarki, podwielokrotności (np. 1 ml) gazu są pobierane z fazy gazowej nad roztworem w każdej butli i wstrzykiwane do analizatora węgla nieorganicznego. Zmierzone stężenia węgla nieorganicznego rejestruje się w mg C/l.

▼M4

53. Zgodnie z zasadą tej metody po zakwaszeniu do pH < 3 i pozostawieniu do ustalenia stanu równowagi w temperaturze 20 °C stała równowagi rozmieszczenia CO_2 między fazami ciekłą a gazową w butlach do badania wynosi 1,0, jeżeli jest mierzona jako stężenie (13). Należy to co najmniej raz wykazać dla układu badawczego w następujący sposób:

Przygotować butle zawierające 5 i 10 mg/l węgla nieorganicznego, wykorzystując roztwór bezwodnego węglanu sodu (Na_2CO_3) w wolnej od CO_2 wodzie przygotowanej poprzez zakwaszenie wody do pH 6,5 za pomocą stężonego kwasu ortofosforowego (pkt 20), napowietrzenie przez noc powietrzem niezawierającym CO_2 i podniesienie pH do poziomu obojętnego za pomocą zasady. Należy dopilnować, aby stosunek objętości fazy gazowej nad roztworem do objętości cieczy był taki sam jak w badaniu (np. 1:2). Należy zakwasić i pozostawić do ustalenia stanu równowagi w sposób opisany w pkt 52, a następnie zmierzyć stężenie węgla nieorganicznego w fazie gazowej nad roztworem i w fazie ciekłej. Trzeba sprawdzić, czy oba stężenia są jednakowe w dopuszczalnych granicach błędu badania. Jeżeli nie, operator powinien dokonać przeglądu procedur. Tej kontroli rozmieszczenia węgla nieorganicznego pomiędzy fazami ciekłą i gazową nie trzeba przeprowadzać za każdym razem, gdy wykonuje się badanie. Przypuszczalnie można byłoby przeprowadzać ją podczas kalibracji.

54. Jeżeli ma zostać zmierzone usuwanie rozpuszczalnego węgla organicznego (wyłącznie w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczalnych w wodzie), próbki należy pobrać z fazy ciekłej z oddzielnych (niezakwaszonych) butli, przefiltrować przez filtr membranowy i wstrzyknąć do analizatora rozpuszczalnego węgla organicznego. W razie konieczności można te butle wykorzystać do innych analiz, aby zmierzyć biodegradację pierwotną.

Metoda b): przekształcenie CO_2 w węglan

55. Przed każdą serią analiz analizator węgla nieorganicznego jest kalibrowany przy użyciu odpowiedniej normy - na przykład roztworu wodorowęglanu sodu ($NaHCO_3$) w wodzie wolnej od CO_2 (zob. pkt 53) w przedziale od 0 do 20 mg/l jako węgiel nieorganiczny. Roztwór wodorotlenku sodu (7M, pkt 21) (np. 1 ml na 107 ml pożywki) wstrzykuje się przez przykrywkę każdej butli, z których pobiera się próbki, a butle wytrząsa się przez godzinę w temperaturze badania. Należy użyć tego samego roztworu NaOH na wszystkich butlach przeznaczonych na określony dzień, lecz niekoniecznie podczas każdego pobierania próbek w czasie trwania badania. Jeżeli przy każdym pobieraniu próbek potrzebne są bezwzględne ślepe wartości węgla nieorganicznego, oznaczanie węgla nieorganicznego w roztworze NaOH będzie niezbędne przy każdym użyciu tego roztworu. Butle wyjmuje się z wytrząsarki i odstawia do ustalenia. Z każdego naczynia pobiera się strzykawką odpowiednie objętości (np. 50 do 1 000 µl) fazy ciekłej. Próbki wstrzykuje się do analizatora węgla nieorganicznego i rejestruje stężenia. Należy dopilnować, aby używany analizator był odpowiednio wyposażony do analizowania próbek zasadowych otrzymywanych w ramach tej metody.

56. Zgodnie z zasadą tej metody po dodaniu zasady i wytrząsaniu stężenie węgla nieorganicznego w fazie gazowej nad roztworem jest nieznaczne. Należy to co najmniej raz skontrolować dla układu badawczego, stosując normy dotyczące węgla nieorganicznego, poprzez dodanie zasady, pozostawienie do ustalenia stanu równowagi i zmierzenie stężenia węgla nieorganicznego w fazie gazowej nad roztworem i w fazie ciekłej (zob. pkt 53). Stężenie w fazie gazowej nad roztworem powinno być zbliżone do zera. Tej kontroli praktycznie całkowitej absorpcji CO_2 nie trzeba przeprowadzać za każdy razem, gdy przeprowadza się badanie.

57. Jeżeli ma zostać zmierzone usuwanie rozpuszczalnego węgla organicznego (wyłącznie w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczalnych w wodzie), próbki należy pobrać z fazy ciekłej z oddzielnych (niezawierających dodatku zasady) butli, przefiltrować przez filtr membranowy i wstrzyknąć do analizatora rozpuszczalnego węgla organicznego. W razie konieczności można te butle wykorzystać do innych analiz, aby zmierzyć biodegradację pierwotną.

▼M4

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Obliczanie wyników

58. Przy założeniu 100 % mineralizacji badanej substancji chemicznej na CO_2, nadwyżka ThIC wytworzonego w ślepych próbach kontrolnych jest równa TOC dodanemu do każdej butli do badania na początku badania, czyli:

$$ThIC = TOC$$

Całkowita masa (mg) nieorganicznego węgla (TIC) w każdej butli wynosi:

$$TIC = (\text{mg C w plynie} + \text{mg C w fazie gazowej nad roztworem}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{równanie [1]}$$

gdzie:

V_L = objętość płynu w butli (w litrach),

CL = stężenie IC w płynie (mg/l w przeliczeniu na węgiel),

VH = objętość fazy gazowej nad roztworem (w litrach),

CH = stężenie IC w fazie gazowej nad roztworem (mg/l w przeliczeniu węgiel).

Obliczenia TIC na potrzeby dwóch metod analitycznych stosowanych do pomiaru węgla nieorganicznego w opisanym tu badaniu omówiono w pkt 60 i 61 poniżej. Procentową biodegradację (*% D*) w każdym przypadku uzyskuje się w następujący sposób:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \quad \text{równanie [2]}$$

gdzie:

TICt = mg TIC w butli do badania w czasie t,

TICb = średni mg TIC w butlach zawierających próby ślepe w czasie t,

TOC = mg TOC dodany na początku badania do naczynia do badania.

Procentową biodegradację % D oblicza się dla butli do badania (F_T), butli odniesienia (F_C) oraz, jeśli zastosowano, butli do monitorowania działania hamującego (F_I), na podstawie odpowiednich ilości TIC wytworzonego do czasu każdego pobierania próbek.

59. W przypadku znaczącego wzrostu zawartości TIC w kontrolach sterylnych (F_S) w czasie trwania badania można uznać, że zaszedł abiotyczny rozkład badanej substancji chemicznej i należy to uwzględnić w obliczeniach D w równaniu [2].

Zakwaszanie do pH < 3

60. Jako że zakwaszenie do pH < 3 i ustalenie równowagi skutkują wyrównaniem się stężenia TIC w fazie płynnej i gazowej, jedynie stężenie IC w fazie gazowej wymaga pomiaru. Tym samym z równania [1] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, gdzie V_B = objętość butli z surowicą.

Przekształcenie CO_2 w węglan

61. W ramach tej metody obliczenia wykonuje się tak jak w równaniu [1], ale nie uwzględnia się nieznacznej ilości IC w fazie gazowej, czyli $V_H \times C_H = 0$, a $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Prezentacja wyników

62. Krzywą biodegradacji uzyskuje się poprzez wykreślenie procentowej biodegradacji D w czasie inkubacji oraz, jeśli jest to możliwe, wskazuje się fazę zastoju, fazę biodegradacji, 10-dniowe „okno" i fazę plateau, czyli fazę, w której osiągnięto maksymalny rozkład, a krzywa biodegradacji wyrównała się. Jeśli uzyskano porównywalne wyniki dla równoległych naczyń do badania F_T (& 20 % różnicy), wykreśla się średnią krzywą (zob. dodatek 2, rysunek 1); jeśli nie – wykreśla się krzywe dla każdego naczynia. Określa się średnią wartość procentowej biodegradacji w fazie plateau lub dokonuje się oszacowania najwyższej wartości (np. kiedy krzywa spada w fazie plateau), ale istotne jest, by mieć na uwadze, że w tym drugim przypadku wartość ta nie może być wartością odstającą. W sprawozdaniu z badania należy wskazać maksymalny stopień biodegradacji jako „stopień biodegradacji badanej substancji chemicznej". Jeśli liczba naczyń do badania nie była wystarczająca do wskazania fazy plateau, zmierzone dane z ostatniego dnia badania wykorzystuje się do obliczenia wartości średniej. Taka ostatnia wartość, będąca średnią pięciu replikatów, pozwala na wskazanie dokładności, z jaką określono wartość procentową biodegradacji. Należy także przedstawić wartość uzyskaną na koniec okresu 10-dniowego „okna".

63. W taki sam sposób wykreśla się krzywą dla substancji odniesienia, F_C, oraz, jeśli je zastosowano, kontroli eliminacji abiotycznej, F_S, i kontroli działania hamującego, F_I.

64. Ilości TIC obecne w ślepych próbach kontrolnych (F_B) odnotowuje się jako te w kolbach F_S (kontrola abiotyczna), jeśli takie naczynia uwzględniono w badaniu.

65. Należy obliczyć D dla naczyń F_I, w oparciu o teoretyczny wynik IC spodziewany jedynie ze składnika odniesienia mieszaniny. Jeśli, w dniu 28. $[(D_{FC}\ (^1) - D_{FI}\ (^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, można założyć, że badana substancja chemiczna zahamowała działanie inokulum, co może wiązać się z niskimi wartościami D_{FT} uzyskanymi w warunkach badania. W takim przypadku badanie można powtórzyć z wykorzystaniem niższego badanego stężenia, a najlepiej zmniejszając DIC w inokulum oraz TIC powstały w ślepych próbach kontrolnych, jako że w przeciwnym wypadku mniejsze stężenie zmniejszy dokładność metody. Można także wykorzystać inne inokulum. Jeśli w butelkach F_S (abiotyczne) obserwuje się znaczny wzrost (> 10 %) ilości TIC, mogły zajść procesy rozkładu abiotycznego.

Ważność wyników

▼M7

66. Badanie uznaje się za ważne, jeśli:

a) średni procentowy rozkład w naczyniach F_C zawierających substancję chemiczną odniesienia wynosi > 60 % do 14. dnia inkubacji; oraz

b) średnia ilość TIC obecnego w ślepych próbach kontrolnych F_B na koniec badania wynosi > 3 mg C/l.

Jeśli te pułapy nie zostały osiągnięte, badanie należy powtórzyć z wykorzystaniem inokulum z innego źródła lub należy dokonać przeglądu procedur. Na przykład jeśli problem stanowi wysoka wartość IC wytworzonego w próbie ślepej, należy zastosować procedurę opisaną w pkt 27–32.

(1) Procentowy rozkład w naczyniu F_C zawierającym substancję odniesienia.
(2) Procentowy rozkład w naczyniu F_I.

▼M4

67. Jeśli badana substancja chemiczna nie osiąga 60 % ThIC oraz wykazano, że nie ma działania hamującego (pkt 65), badanie można powtórzyć ze zwiększonym stężeniem inokulum (do 30 mg/l osadu czynnego i 100 ml wcieku/l) lub inokulami z innych źródeł, zwłaszcza jeśli rozkład mieścił się w przedziale 20 do 60 %.

Interpretacja wyników

68. Biodegradacja > 60 % ThIC w ciągu 10-dniowego „okna" w opisanym tu badaniu pokazuje, że badana substancja chemiczna ulega szybkiej biodegradacji w warunkach tlenowych.

69. Jeśli nie osiągnięto wartości progowej 60 % ThIC, należy określić wartość pH w pożywkach w butlach, których odczynu nie zmieniono na kwaśny ani zasadowy; wartość poniżej 6,5 może wskazywać, że doszło do nitryfikacji. W takim przypadku badanie należy powtórzyć z zastosowaniem roztworu buforowego o wyższym stężeniu.

Sprawozdanie z badania

70. Należy sporządzić tabelę z % D dla każdej butli do badania (F_T), butli odniesienia (F_c) oraz, jeśli zastosowano, kontrolnej butli działania hamującego (F_I) dla każdego dnia pobierania próbek. Jeśli dla butli z replikatami uzyskano porównywalne wyniki, należy wykreślić krzywą średniej % D w czasie. Należy odnotować wartości TIC w ślepych próbach kontrolnych (F_B) oraz w sterylnych próbach kontrolnych (F_S), a także DOC lub inne wyznaczniki oraz ich procentowe usuwanie.

71. Należy określić średnią wartość % D w fazie plateau lub zastosować najwyższą wartość, jeśli krzywa biodegradacji spada w fazie plateau, oraz przedstawić ją jako „stopień biodegradacji badanej substancji chemicznej". Ważne, by upewnić się, że w drugim przypadku najwyższa wartość nie jest wartością odstającą.

72. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna, numer w rejestrze CAS, wzór strukturalny i istotne właściwości fizykochemiczne,

— czystość (zanieczyszczenia) badanej substancji chemicznej.

Warunki badania

— odniesienie do niniejszej metody badawczej,

— opis zastosowanego układu badawczego (np. objętość naczynia, stosunek przestrzeni nadpowierzchniowej do płynu, metoda mieszania itp.),

— wprowadzenie badanej substancji chemicznej oraz substancji odniesienia do układu badawczego; zastosowane badane stężenie i ilość węgla dawkowana do każdej butli do badania, wszelkie zastosowane rozpuszczalniki,

— szczegółowe informacje na temat zastosowanego inokulum, wszelkiego wstępnego poddawania działaniu substancji i wstępnego przygotowywania,

— temperatura inkubacji,

— walidacja zasady analizy IC,

— główne cechy charakterystyczne zastosowanego analizatora IC (oraz wszelkie inne zastosowane metody analityczne),

— liczba replikatów.

Wyniki

— dane surowe i obliczone wartości dotyczące biodegradowalności w formie tabeli,

▼M4

— wykres procentowego rozkładu w czasie dotyczący badanej substancji chemicznej i substancji odniesienia, faza zastoju, faza rozkładu, 10-dniowe „okno” oraz nachylenie krzywej,

— procentowe usuwanie w fazie plateau, na koniec badania oraz po okresie 10-dniowego „okna”,

— uzasadnienie w przypadku ewentualnego odrzucenia wyników badania,

— wszelkie inne fakty, które są istotne dla przeprowadzonej procedury,

— omówienie wyników.

BIBLIOGRAFIA:

(1) Rozdział C.4 niniejszego załącznika: Oznaczenie biodegradowalności – badanie wydzielania 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 i Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; zmienione w 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 i Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801–812.

(10) Ennis DM i 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 i Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233–243.

(13) Struijs J i Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204–211.

(14) Birch RR i 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, i 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 i Starkey M (1999). An „inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219–3235.

(20) Rozdział C.4 niniejszego załącznika: Oznaczenie biodegradowalności.

(21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano i M. Takatsuki; CITI). Paryż.

(22) Rozdział 11 niniejszego załącznika, Badanie zahamowania oddychania osadu czynnego.

(23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ i Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319–327.

(24) UE (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, Zjednoczone Królestwo.

(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

Dodatek 1

SKRÓTY I DEFINICJE

IC: węgiel nieorganiczny

$ThCO_2$: teoretyczny dwutlenek węgla (mg) to ilość dwutlenku węgla obliczona jako wytworzona ze znanej lub zmierzonej zawartości węgla w badanej substancji chemicznej, przy pełnej mineralizacji; wyrażana także jako mg dwutlenku węgla wydzielonego na mg badanej substancji chemicznej.

DOC: rozpuszczony węgiel organiczny to węgiel organiczny obecny w roztworze lub taki, który przechodzi przez filtr o średnicy 0,45 mikrometra lub pozostaje w supernatancie po odwirowaniu przy ok. 4 000 g (około 40 000 m sec^{-2}) przez 15 min.

DIC: rozpuszczony węgiel nieorganiczny

ThIC: teoretyczny węgiel nieorganiczny

TIC: całkowity węgiel nieorganiczny

Ulegający szybkiej biodegradacji: arbitralna klasyfikacja substancji chemicznych, które spełniają kryteria pewnych określonych badań przesiewowych dotyczących ostatecznej biodegradacji; badania te są tak rygorystyczne, iż zakłada się, że takie substancje chemiczne szybko i w pełni ulegną biodegradacji w środowisku wodnym w warunkach tlenowych.

10-dniowe „okno”: 10 dni bezpośrednio po osiągnięciu 10 % biodegradacji.

Biodegradowalność naturalna: klasyfikacja substancji chemicznych, w przypadku których istnieją jednoznaczne dowody na biodegradację (pierwotną lub ostateczną) wynikające z jakiegokolwiek badania biodegradowalności.

Ostateczna biodegradacja tlenowa: stopień rozkładu osiągnięty, kiedy badana substancja chemiczna jest w pełni zutylizowana przez mikroorganizmy w wyniku wytwarzania dwutlenku węgla, wody, soli mineralnych i nowych elementów komórek (biomasa).

Mineralizacja: całkowity rozkład organicznej substancji chemicznej na CO_2 i H_2O w warunkach tlenowych, oraz na CH_4, CO_2 i H_2O w warunkach beztlenowych.

Faza zastoju: czas od początku badania do czasu aklimatyzacji lub adaptacji mikroorganizmów rozkładających oraz do czasu zwiększenia się stopnia biodegradacji badanej substancji chemicznej lub materii organicznej do wykrywalnego poziomu (np. 10 % maksymalnej teoretycznej biodegradacji lub mniej, w zależności od dokładności techniki pomiaru).

Faza rozkładu: czas od zakończenia okresu zastoju do czasu osiągnięcia 90 % maksymalnego stopnia rozkładu.

Faza plateau: faza, podczas której osiągnięto maksymalny rozkład, a krzywa biodegradacji wyrównała się.

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

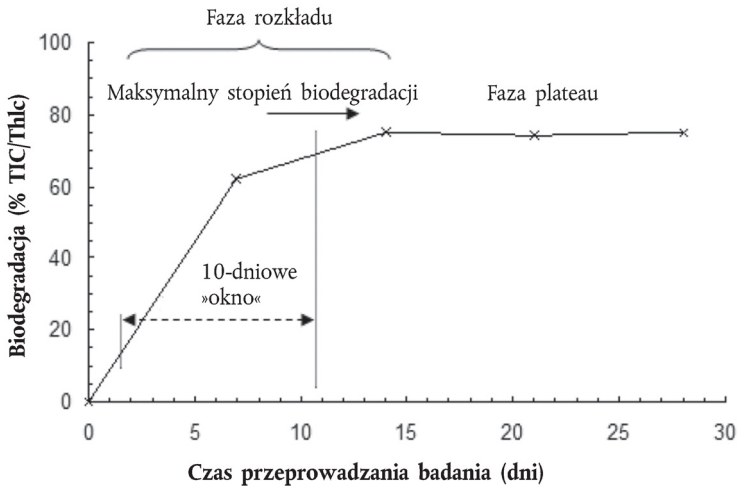
▼**M4**

Dodatek 2

Przykładowa krzywa biodegradacji

Rysunek 1

Biodegradacja 1-oktanolu w ramach badania CO_2 w fazie gazowej nad roztworem



Glosariusz:

Biodegradacja

Faza rozkładu

Maksymalny stopień biodegradacji

Faza plateau

10-dniowe „okno”

Czas przeprowadzania badania (dni)

▼M4

C. 30. **BIOAKUMULACJA W SKĄPOSZCZETACH LĄDOWYCH**

WSTĘP

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 317 (OECD TG 317) (2010). W odniesieniu do metod badawczych dotyczących wpływu na środowisko metodę „Biokoncentracja: badanie ryb w warunkach przepływu" (rozdział C.13 niniejszego załącznika (49)) oraz metodę „Bioakumulacja w bentosowych skąposzczetach żyjących w osadzie" (53) opublikowano odpowiednio w 1996 i 2008 r. Ekstrapolacja danych dotyczących bioakumulacji w gatunkach wodnych na organizmy lądowe, takie jak dżdżownice, jest trudna, a często w ogóle niemożliwa. Do oceny bioakumulacji substancji chemicznych w glebie stosuje się obecnie modele obliczeniowe oparte na lipofilności badanej substancji chemicznej, np. (14) (37), na przykład w wytycznych technicznych UE (19). Potrzeba opracowania metody badawczej specyficznej dla danego ustroju została już poruszona, np. (55). Taka metoda jest w szczególności istotna w ocenie zatrucia wtórnego w lądowych łańcuchach pokarmowych (4). Istnieje kilka krajowych metod badawczych, za pomocą których bada się kwestię bioakumulacji w organizmach innych niż ryby, np. (2) i (72). Metodę pomiaru bioakumulacji z zanieczyszczonych gleb w dżdżownicach (*Eisenia fetida*, Savigny) i wazonkowcowatych opracowało Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów (ASTM) (3). Uznana na scenie międzynarodowej metoda określania bioakumulacji w glebie wzbogaconej zwiększy efektywność oceny ryzyka związanego z obecnością substancji chemicznych w ekosystemach lądowych, np. (25) (29).

2. Bezkręgowce spożywające glebę są narażone na związane w glebie substancje chemiczne. Wśród takich zwierząt są skąposzczety lądowe, które odgrywają ważną rolę dla struktury i funkcji gleb (15) (20). Skąposzczety lądowe żyją w glebie i częściowo na powierzchni gleby (zwłaszcza w ściółce); często stanowią najliczniejszą grupę gatunków w biomasie (54). Przyczyniając się do bioturbacji gleby oraz stanowiąc żer dla innych zwierząt, zwierzęta te mogą mieć silny wpływ na biodostępność substancji chemicznych dla innych organizmów, takich jak bezkręgowce (np. drapieżne roztocza i chrząszcze; np. (64)) lub drapieżniki z grupy kręgowców (np. lisy i mewy) (18) (62). Niektóre gatunki skąposzczetów lądowych wykorzystywane obecnie w badaniach ekotoksykologicznych opisano w dodatku 5.

3. W opracowanym przez ASTM standardowym przewodniku dotyczącym przeprowadzania badań laboratoryjnych toksyczności i bioakumulacji w glebie z wykorzystaniem gatunku z rodziny dżdżownicowatych *Eisenia fetida* oraz gatunku z rodziny wazonkowcowatych *Enchytraeus albidus* (3) przedstawiono wiele ważnych i użytecznych szczegółowych informacji na temat wyników niniejszej metody badawczej dotyczącej bioakumulacji w glebie. Inne dokumenty, do których odniesienia zawiera niniejsza metoda badawcza, to rozdział C.13 niniejszego załącznika „Biokoncentracja: badanie ryb w warunkach przepływu" (49) oraz OECD TG 315 „Bioakumulacja w bentosowych skąposzczetach żyjących w osadzie" (53). Ważnymi źródłami informacji na temat niniejszej metody badawczej są również praktyczne doświadczenia dotyczące badań nad bioakumulacją w glebie opisane w literaturze, np. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79).

4. Niniejsza metoda badawcza może w większości przypadków być stosowana w odniesieniu do stabilnych, neutralnych organicznych substancji chemicznych, które ulegają adsorpcji do gleb. Za pomocą niniejszej metody badawczej możliwe jest badanie pod kątem bioakumulacji wiązanych w glebie, stabilnych związków metaloorganicznych. Metoda ta ma zastosowanie również w przypadku metali i innych pierwiastków śladowych.

WARUNEK KONIECZNY

5. Badania pomiaru bioakumulacji substancji chemicznej w skąposzczetach lądowych przeprowadza się z wykorzystaniem metali ciężkich (zob. np. (63)) oraz trwałych organicznych substancji chemicznych o wartościach log K_{ow} pomiędzy 3,0 a 6,0, np. (40). Takie badania mają także zastosowanie do:

— substancji chemicznych o log K_{ow} powyżej 6,0 (super-hydrofobowe substancje chemiczne),

▼M4

— substancji chemicznych, które należą do klasy organicznych substancji chemicznych, o których wiadomo, że mają zdolność do bioakumulacji w żywych organizmach, np. substancji powierzchniowo czynnych lub wysoce adsorpcyjnych,

— substancji chemicznych, które wskazują na zdolność do bioakumulacji z racji właściwości strukturalnych, np. analogi substancji chemicznych, o których wiadomo, że mają zdolność do bioakumulacji, oraz

— metali.

6. Informacje na temat badanej substancji chemicznej, takie jak nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna (najlepiej nazwa IUPAC), wzór strukturalny, numer w rejestrze CAS, czystość, środki ostrożności, odpowiednie warunki przechowywania oraz metody analityczne, należy uzyskać przed rozpoczęciem badania. Ponadto znane powinny być następujące informacje:

a) rozpuszczalność w wodzie;

b) współczynnik podziału oktanol/woda, K_{ow};

c) współczynnik podziału gleba-woda, wyrażony jako K_{oc};

d) prężność par;

e) podatność na rozkład (np. w glebie, wodzie);

f) znane metabolity.

7. Można zastosować badane substancje chemiczne znakowane izotopowo lub nieznakowane izotopowo. Aby ułatwić analizę, zaleca się jednak stosowanie substancji chemicznej znakowanej izotopowo. Taką decyzję należy podjąć na podstawie granic wykrywalności lub wymogu pomiaru macierzystej badanej substancji chemicznej i metabolitów. Jeśli stosuje się badaną substancję chemiczną znakowaną izotopowo i dokonuje się pomiaru całkowitych pozostałości radioaktywnych, ważne jest, by znakowane izotopowo pozostałości, zarówno w glebie, jak i w organizmach badanych, zostały scharakteryzowane pod kątem procentowej zawartości macierzystej badanej substancji chemicznej i znakowanej niemacierzystej substancji chemicznej, np. w próbkach pobranych w stanie ustalonym lub pod koniec etapu absorpcji, w celu umożliwienia obliczenia współczynnika bioakumulacji dla macierzystej badanej substancji chemicznej i danych metabolitów w glebie (zob. pkt 50). Konieczne może być zmodyfikowanie opisanej tu metody, np. w celu zapewnienia wystarczającej biomasy, na potrzeby pomiaru nieznakowanych izotopowo organicznych badanych substancji chemicznych lub metali. Przy pomiarze całkowitych pozostałości radioaktywnych (za pomocą scyntylacyjnego licznika cieczowego po ekstrakcji, spaleniu lub rozpuszczeniu tkanek) współczynnik bioakumulacji określa się na podstawie macierzystej badanej substancji chemicznej i metabolitów. Współczynnik bioakumulacji należy obliczyć na podstawie stężenia macierzystej badanej substancji chemicznej w organizmach oraz całkowitych pozostałości radioaktywnych. Następnie na podstawie współczynnika bioakumulacji należy obliczyć współczynnik akumulacji biota-gleba, znormalizowany do zawartości lipidów organizmu oraz zawartości węgla organicznego w glebie, aby zapewnić porównywalność wyników z różnych badań bioakumulacji.

8. Toksyczność badanej substancji chemicznej dla gatunków wykorzystanych w badaniu powinna być znana, np. stężenie efektywne (ECx) lub stężenie śmiertelne (LCx) dla okresu etapu absorpcji (np. (19)). Wybrane stężenie badanej substancji chemicznej powinno wynosić około 1 % jej ostrego bezobjawowego LC_{50}, oraz powinno być co najmniej dziesięciokrotnie wyższe niż jej granica wykrywalności w glebie dla zastosowanej metody analitycznej. Preferowanymi wartościami dotyczącymi toksyczności są wartości pozyskane z długoterminowych badań nad subletalnymi punktami końcowymi (51) (52), jeśli takie dane są dostępne. Jeśli jednak nie są one dostępne, pomocnych informacji dostarczy badanie toksyczności ostrej (zob. np. (23)).

▼M4

9. Dostępna powinna być odpowiednia metoda analityczna o znanej dokładności, precyzji oraz czułości w celu oznaczenia ilościowego substancji chemicznej w badanych roztworach, w glebie oraz w materiale biologicznym, wraz ze szczegółowymi informacjami na temat przygotowania i przechowywania próbek oraz kartami charakterystyki materiałów. Znane powinny być także analityczne granice wykrywalności jednostki badanej w glebie oraz tkance organizmów. Jeśli stosuje się badaną substancję chemiczną znakowaną węglem 14C, znana powinna być promieniotwórczość właściwa (np. Bq mol-1) oraz odsetek promieniotwórczości związany z zanieczyszczeniami. Promieniotwórczość właściwa badanej substancji chemicznej powinna być dostatecznie wysoka, aby ułatwić analizę, zaś stężenia badane nie powinny wywoływać skutków toksycznych.

10. Badanie można przeprowadzić z wykorzystaniem gleby sztucznej lub gleb naturalnych. Informacje na temat cech charakterystycznych zastosowanej gleby naturalnej, np. pochodzenia gleby lub jej składników, pH, zawartości węgla organicznego, rozkładu wielkości cząstek (procent piasku, iłu i gliny) oraz zdolności zatrzymywania wody, powinny być znane przed rozpoczęciem badania (3) (48).

ZASADA BADANIA

11. Parametry, które charakteryzują bioakumulację badanej substancji chemicznej obejmują współczynnik bioakumulacji (BAF), stałą szybkości absorpcji (k_s) oraz stałą szybkości eliminacji (k_e). Ich definicje podano w dodatku 1.

12. Badanie składa się z dwóch etapów: etapu absorpcji (narażenia) i etapu eliminacji (po narażeniu). Podczas etapu absorpcji replikaty z grupami organizmów poddaje się narażeniu poprzez glebę, którą wzbogacono badaną substancją chemiczną. Oprócz zwierząt badanych, w identycznych warunkach niezawierających jednak badanej substancji chemicznej przetrzymuje się grupy organizmów kontrolnych. Mierzy się masę suchą i zawartość lipidów organizmów badanych. Pomiary można przeprowadzić z wykorzystaniem organizmów z grupy kontrolnej. Wartości dotyczące analizy tła (ślepa próba) można uzyskać poprzez analizę próbek organizmów kontrolnych i gleby. Na potrzeby etapu eliminacji organizmy przenosi się do gleby niezawierającej badanej substancji chemicznej. Etap eliminacji jest zawsze wymagany, chyba że absorpcja badanej substancji chemicznej podczas etapu narażenia nie była znacząca. Etap eliminacji dostarcza informacji na temat szybkości, z jaką badana substancja chemiczna jest wydalana przez organizmy badane (np. (27)). Jeśli podczas etapu absorpcji nie osiągnięto stanu ustalonego, parametry kinetyczne – kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAFk), stałą lub stałe szybkości absorpcji i eliminacji – należy określić w oparciu o jednoczesne dopasowanie wyników z etapu absorpcji i eliminacji. Stężenie badanej substancji chemicznej w/na organizmach monitoruje się w trakcie obydwu etapów badania.

13. Podczas etapu absorpcji pomiarów dokonuje się w chwili pobierania próbek przez okres trwający do 14 dni (w przypadku wazonkowcowatych) lub 21 dni (w przypadku dżdżownic), do czasu osiągnięcia stanu ustalonego (11) (12) (67). Stan ustalony zachodzi, gdy wykres stężenia w organizmach w czasie jest równoległy do osi czasu, a trzy następujące po sobie analizy stężenia wykonane na próbkach pobranych w odstępach czasowych co najmniej dwóch dni nie różnią się od siebie więcej niż o ± 20 % na podstawie porównań statystycznych (np. analiza wariancji, analiza regresji).

14. Etap eliminacji składa się z przeniesienia organizmów badanych do naczyń z takim samym podłożem, lecz niezawierającym badanej substancji chemicznej. Podczas etapu eliminacji pomiarów dokonuje się w chwili pobierania próbek przez 14 dni (w przypadku wazonkowcowatych) lub 21 dni (w przypadku dżdżownic), o ile wcześniej oznaczenie analityczne nie wykaże redukcji

▼M4

pozostałości badanej substancji chemicznej w organizmach na poziomie 90 %. Stężenie badanej substancji chemicznej w organizmach pod koniec etapu eliminacji przedstawia się w sprawozdaniu jako niewyeliminowane pozostałości. Współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym (BAFss) należy obliczać zarówno jako stosunek stężenia w organizmach (Ca) i w glebie (Cs) przy ewidentnym stanie ustalonym, jak i jako kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAFK), czyli stosunek stałej szybkości absorpcji z gleby (ks) oraz stałej szybkości eliminacji (ke) (zob. definicje w dodatku 1), przy założeniu kinetyki reakcji pierwszego rzędu (zob. obliczenia w dodatku 2). Jeśli w sposób ewidentny kinetyka reakcji pierwszego rzędu nie znajduje zastosowania, należy zastosować inne modele.

15. Stała szybkości absorbcji, stała szybkości eliminacji (lub stałe, jeśli zastosowano inne modele), kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAFK) oraz, tam, gdzie to możliwe, granice ufności każdego z tych parametrów, oblicza się za pomocą komputerowych modeli równań (zob. wytyczne w dodatku 2). Odpowiedniość dopasowania modelu można określić na podstawie, na przykład, współczynnika korelacji lub współczynnika determinacji (współczynniki o wartościach zbliżonych do 1 wskazują na dobre dopasowanie) lub chi-kwadrat. Zakres błędu standardowego lub granicy ufności dla szacowanych parametrów także może wskazywać na odpowiedniość dopasowania modelu.

16. Aby zmniejszyć zróżnicowanie wyników badania dla badanych substancji chemicznych o wysokim poziomie lipofilności, współczynniki bioakumulacji należy wyrazić w odniesieniu do zawartości lipidów oraz węgla organicznego (kg węgla organicznego w glebie kg-1 zawartości lipidów w organizmie). Takie podejście wynika z faktu, że w przypadku niektórych klas substancji chemicznych istnieje wyraźne powiązanie między zdolnością do bioakumulacji a lipofilnością; zostało to potwierdzone w przypadku ryb (47). Istnieje związek między zawartością lipidów w rybach a bioakumulacją takich substancji chemicznych. W przypadku organizmów bentosowych stwierdzono podobne korelacje, np. (30) (44). Taką korelację wykazano także w przypadku skąposzczetów lądowych, np. (5) (6) (7) (14). Jeśli dostępna jest wystarczająca ilość tkanek organizmów, zawartość lipidów w zwierzętach badanych można określić z wykorzystaniem tego samego materiału biologicznego, który zastosowano do określenia stężenia badanej substancji chemicznej. Do pomiaru zawartości lipidów można wykorzystać także zwierzęta kontrolne.

WAŻNOŚĆ BADANIA

17. Aby badanie było ważne, grupy kontrolne oraz grupy poddane działaniu substancji muszą spełnić następujące kryteria:

— pod koniec badania całkowita śmiertelność podczas etapu absorpcji i etapu eliminacji nie powinna przekroczyć 10 % (w przypadku dżdżownic) lub 20 % (w przypadku wazonkowcowatych) całkowitej liczby organizmów wykorzystanych w badaniu,

— w przypadku gatunków *Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* średnia strata masy według pomiarów na koniec etapu absorpcji i na koniec etapu eliminacji nie powinna przekraczać 20 % w porównaniu z początkową żywą wagą na początku każdego z etapów.

OPIS METODY

Badane gatunki

18. Do badania bioakumulacji zaleca się wykorzystanie kilku gatunków skąposzczetów lądowych. Najczęściej stosowane gatunki, *Eisenia fetida* lub *Eisenia andrei* (dżdżownicowate), lub też *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* lub *Enchytraeus luxuriosus* (wazonkowcowate), opisano w dodatku 5.

▼M4

Przyrządy

19. Należy dołożyć starań, aby unikać stosowania materiałów, w odniesieniu do wszystkich części sprzętu, które mogą rozpuścić badaną substancję chemiczną, sprawić, że ulegnie ona adsorpcji, lub też wypłukać inne substancje chemiczne, a także materiałów, które mają szkodliwe działanie na zwierzęta badane. Można zastosować standardowe prostokątne lub cylindryczne naczynia, wykonane z chemicznie obojętnego materiału i posiadające odpowiednią pojemność, zgodnie ze wskaźnikiem obciążenia, tj. liczbą organizmów badanych. Sprzęt mający kontakt z badanymi pożywkami może być wykonany ze stali nierdzewnej, plastiku lub szkła. Naczynia do badania należy odpowiednio nakrywać, aby zapobiec uciekaniu organizmów, jednocześnie zapewniając im wystarczający dopływ powietrza. W przypadku substancji chemicznych o wysokich współczynnikach adsorpcji, takich jak syntetyczne pyretroidy, konieczne może być zastosowanie szkła silanizowanego. W takich sytuacjach sprzęt po użyciu należy wyrzucić (49). Jednostki badane znakowane izotopowo oraz substancje lotne należy zabezpieczyć przed uchodzeniem. Należy zastosować pułapki (np. szklane płuczki gazowe) zawierające odpowiednie absorbenty zatrzymujące wszelkie pozostałości odparowujące z naczyń do badania.

Gleba

20. Badana gleba powinna być takiej jakości, która pozwoli na przeżycie oraz optymalnie także rozmnażanie organizmów badanych w okresie aklimatyzacji i badanych okresów, przy czym takie organizmy nie powinny charakteryzować się nieprawidłowym wyglądem ani zachowaniem. Organizmy powinny zakopywać się w glebie.

21. Jako podłoże w badaniach zaleca się wykorzystanie sztucznej gleby opisanej w rozdziale C.8 niniejszego załącznika (48). Opis przygotowania sztucznej gleby do wykorzystania w badaniach bioakumulacji oraz zalecenia dotyczące przechowywania sztucznej gleby podano w dodatku 4. Wysuszoną powietrzem sztuczną glebę można przechowywać do czasu jej wykorzystania w temperaturze pokojowej.

22. Naturalne gleby z niezanieczyszczonych miejsc mogą jednak również posłużyć jako gleba badana lub jako gleba do hodowli. Gleby naturalne należy scharakteryzować, podając co najmniej ich pochodzenie (miejsce zebrania), pH, zawartość węgla organicznego, rozkład wielkości cząstek (procent piasku, iłu i gliny), maksymalną zdolność zatrzymywania wody oraz procentową zawartość wilgoci (3). Użytecznych informacji powinna dostarczyć także analiza gleby lub jej składników pod kątem mikrozanieczyszczeń, przeprowadzona przed zastosowaniem takiej gleby. Jeśli wykorzystuje się glebę z użytków rolnych, taka gleba nie powinna być wcześniej poddawana działaniu środków ochrony roślin ani obornika od zwierząt poddanych działaniu takich substancji, przez co najmniej jeden rok w przypadku nawozów, a w przypadku nawozów organicznych – przez co najmniej sześć miesięcy przed pobraniem próbek (50). Procedury manipulacji dotyczące gleb naturalnych przed ich zastosowaniem w badaniach ekotoksykologicznych przeprowadzanych z wykorzystaniem skąposzczetów opisano w (3). W przypadku gleb naturalnych okres ich przechowywania w laboratorium powinien być możliwie jak najkrótszy.

Zastosowanie badanej substancji chemicznej

23. Badaną substancję chemiczną wprowadza się do gleby. Pod uwagę należy wziąć fizykochemiczne właściwości badanej substancji chemicznej. Badaną substancję chemiczną rozpuszczalną w wodzie należy przed jej zmieszaniem z glebą całkowicie rozpuścić w wodzie. Zalecana procedura wzbogacania dla badanych substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie obejmuje powleczenie badaną substancją chemiczną jednego lub większej liczby składników (sztucznej) gleby. Na przykład piasek kwarcowy, lub jego część, można namoczyć w roztworze badanej substancji chemicznej i odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego, który następnie powoli odparuje do sucha. Taką powleczoną frakcję można następnie wymieszać z mokrą glebą.

▼M4

Największą zaletą tej procedury jest to, że do gleby nie wprowadza się rozpuszczalnika. W przypadku zastosowania gleby naturalnej badaną substancję chemiczną można dodać poprzez wzbogacenie wysuszonej powietrzem części gleby, zgodnie z opisem dotyczącym sztucznej gleby powyżej, lub poprzez wmieszanie badanej substancji chemicznej do mokrej gleby, przeprowadzając następnie etap odparowania, jeśli zastosowano środek rozpuszczający. Zasadniczo w miarę możliwości należy unikać kontaktu mokrej gleby z rozpuszczalnikami. Należy wziąć pod uwagę następujące kwestie (3):

— Jeśli zastosowano rozpuszczalnik inny niż woda, powinien to być rozpuszczalnik, który można wymieszać z wodą lub odprowadzić (na przykład odparować), pozostawiając na glebie wyłącznie badaną substancję chemiczną.

— Jeśli stosuje się kontrolę rozpuszczalnika, nie ma potrzeby kontroli ujemnej. W kontroli rozpuszczalnika należy zastosować najwyższe stężenie rozpuszczalnika dodane do gleby oraz rozpuszczalnik z tej samej partii, którą wykorzystano do wykonania roztworu podstawowego. Toksyczność i lotność rozpuszczalnika oraz rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w wybranym rozpuszczalniku powinny być głównymi kryteriami branymi pod uwagę przy wyborze odpowiedniego środka rozpuszczającego.

24. W przypadku substancji chemicznych, które są słabo rozpuszczalne w wodzie oraz w rozpuszczalnikach organicznych, z daną ilością badanej substancji chemicznej można wymieszać drobno zmielony piasek kwarcowy, w ilości 2,0-2,5 g na jedno naczynie do badania, np. używając moździerza i tłuczka, w celu otrzymania pożądanego badanego stężenia. Taką mieszaninę piasku kwarcowego i badanej substancji chemicznej dodaje się do uprzednio zwilżonej gleby i dokładnie miesza z odpowiednią ilością dejonizowanej wody w celu otrzymania wymaganej zawartości wilgoci. Otrzymaną mieszaninę przekłada się do naczyń do badania. Procedurę tę powtarza się dla każdego badanego stężenia, a także przygotowuje się odpowiednią kontrolę z wykorzystaniem drobno zmielonego piasku kwarcowego, w ilości 2,0-2,5 g na jedno naczynie do badania.

25. Stężenie badanej substancji chemicznej w glebie należy określić po wzbogacaniu. Jednolite rozprowadzenie badanej substancji chemicznej w glebie należy zweryfikować przed wprowadzeniem badanych organizmów. Metodę zastosowaną do wzbogacania oraz uzasadnienie wyboru określonej procedury wzbogacania, należy przedstawić w sprawozdaniu (24).

26. Równowagę między glebą a wodą porową należy najlepiej uzyskać przed dodaniem organizmów; zaleca się okres czasu wynoszący cztery dni przy temperaturze 20 °C. W przypadku wielu organicznych substancji słabo rozpuszczalnych w wodzie czas wymagany do osiągnięcia prawdziwej równowagi między frakcją, która uległa adsorpcji a frakcją, która uległa rozpuszczeniu, liczy się w dniach lub miesiącach. W zależności od celu badania, na przykład, jeśli dąży się do odtworzenia warunków środowiskowych, wzbogacona gleba może być „postarzana” przez dłuższy okres, np. w przypadku metali może on wynosić trzy tygodnie przy temperaturze 20 °C (22).

Hodowla badanych organizmów

27. Organizmy należy przetrzymywać w stałej kulturze laboratoryjnej. Wytyczne na temat metod dotyczących kultur laboratoryjnych dla gatunków *Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* oraz gatunków z rodziny wazonkowcowatych przedstawiono w dodatku 5 (zob. również (48) (51) (52)).

28. Organizmy wykorzystane w badaniach nie powinny wykazywać dających się zaobserwować oznak chorób, anomalii ani pasożytów.

PRZEPROWADZENIE BADANIA

29. Podczas etapu absorpcji organizmy są narażone na działanie badanej substancji chemicznej. Etap absorpcji powinien trwać 14 dni (w przypadku wazonkowcowatych) lub 21 dni (w przypadku dżdżownic), chyba że wykazano, iż osiągnięto stan ustalony.

▼M4

30. Na potrzeby etapu eliminacji organizmy przenosi się do gleby niezawierającej badanej substancji chemicznej. Pierwszą próbkę należy pobrać po 4-24 godzinach po rozpoczęciu etapu eliminacji. Przykłady harmonogramów pobierania próbek, dla etapu absorpcji trwającego 21 dni i etapu eliminacji trwającego 21 dni, przedstawiono w dodatku 3.

Organizmy badane

31. W przypadku wielu gatunków lądowych z rodziny wazonkowcowatych masa poszczególnych osobników jest bardzo niska (np. 5-10 mg masy mokrej na jednego osobnika w przypadku *Enchytraeus albidus* oraz jeszcze mniej w przypadku *Enchytraeus crypticus* lub *Enchytraeus luxuriosus*); w celu przeprowadzenia pomiarów masy i analizy chemicznej konieczne może być łączne ważenie organizmów z naczyń do badania stanowiących replikaty (tj. wszystkie organizmy z naczynia stanowiącego replikat zostaną wykorzystane do uzyskania jednego wyniku analizy tkanki). Do każdego replikatu dodaje się 20 osobników z rodziny wazonkowcowatych; należy wykorzystać co najmniej trzy replikaty. Jeśli analityczna granica wykrywalności badanej substancji chemicznej jest wysoka, konieczne może być wykorzystanie większej liczby organizmów. W przypadku gatunków badanych o większej masie poszczególnych osobników (*Eisenia fetida* i *Eisenia andrei*) można wykorzystać naczynia stanowiące replikaty zawierające jednego osobnika.

32. Dżdżownice wykorzystane w badaniu powinny mieć podobną masę (np. osobniki z gatunku *Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* powinny mieć masę 250-600 mg na jednego osobnika). Wazonkowcowate (np. *Enchytraeus albidus*) powinny mieć długość około 1 cm. Wszystkie organizmy wykorzystane w konkretnym badaniu powinny pochodzić z tego samego źródła, a także powinny być dorosłymi zwierzętami z klitellum (zob. dodatek 5). Jako że masa i wiek zwierzęcia mogą mieć wpływ na wartości współczynnika bioakumulacji (np. z powodu różnej zawartości lipidów lub obecności jaj), takie parametry należy dokładnie odnotować i wziąć pod uwagę podczas interpretacji wyników. Ponadto w trakcie etapu narażenia może dojść do złożenia kokonów, co również będzie miało wpływ na wartości współczynnika bioakumulacji. Zaleca się zważenie podpróbki organizmów badanych przed rozpoczęciem badania w celu oszacowania ich średniej masy suchej i mokrej.

33. Należy zastosować wysoki stosunek gleby do organizmów w celu zminimalizowania spadku stężenia badanej substancji chemicznej w glebie podczas etapu absorpcji. W przypadku gatunków *Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* zaleca się minimalną ilość wynoszącą 50 g suchej masy gleby na jeden organizm, a w przypadku wazonkowcowatych – co najmniej 10-20 g suchej masy gleby na jedno naczynie do badania. Naczynia powinny zawierać warstwę gleby głębokości 2-3 cm (w przypadku wazonkowcowatych) lub 4-5 cm (w przypadku dżdżownic).

34. Organizmy zastosowane w badaniu usuwa się z hodowli (np. wazonkowcowate za pomocą pęsety jubilerskiej). Dorosłe zwierzęta przenosi się do badanej gleby niepoddanej działaniu badanej substancji chemicznej w celu ich aklimatyzacji, oraz karmi (zob. pkt 36). Jeśli warunki badania różnią się od warunków hodowli, do przystosowania organizmów do warunków badania powinien wystarczyć etap aklimatyzacji trwający 24-72 godziny. Po aklimatyzacji dżdżownice opłukuje się w szklanych naczyniach (np. szalkach Petriego) z czystą wodą, a następnie waży przed wprowadzeniem ich do gleby badanej. Przed ważeniem nadmiar wody należy usunąć z dżdżownic poprzez delikatne otarcie ich o krawędź naczynia lub poprzez ich ostrożne osuszenie za pomocą lekko zwilżonego ręcznika papierowego.

35. Zachowania badanych organizmów związane z zakopywaniem się w glebie należy obserwować i odnotowywać. W badaniach z wykorzystaniem dżdżownic zwierzęta (kontrolne i poddawane działaniu substancji) zazwyczaj zakopują się w glebie w ciągu okresu trwającego kilka godzin. Należy to sprawdzić nie później niż 24 godziny po wprowadzeniu organizmów do naczyń do badania. Jeśli dżdżownice nie zakopują się w glebie (np. ponad 10 % organizmów przez ponad połowę etapu absorpcji), oznacza to, że

▼M4

warunki badania nie są odpowiednie lub badane organizmy nie są zdrowe. W takim przypadku badanie należy przerwać i powtórzyć. Wazonkowcowate żyją w większości przypadków w porach w glebie oraz ich integument często może jedynie częściowo pozostawać w kontakcie z otaczającym ich podłożem. Zakłada się, że narażenie wazonkowcowatych zakopujących się w glebie i niezakopujących się jest równoważne, a więc w przypadku wazonkowcowatych niezakopujących się powtórzenie badania nie jest konieczne.

Karmienie

36. Należy zaplanować karmienie, jeśli stosuje się glebę z niską całkowitą zawartością węgla organicznego. Jeśli zastosowano glebę sztuczną, zaleca się tygodniową porcję pożywienia (tj. organizmy należy karmić raz na tydzień) wynoszącą 7 mg wysuszonego obornika na g masy suchej gleby w przypadku dżdżownic, oraz tygodniową porcję wynoszącą 2-2,5 mg zmielonych płatków owsianych na g masy suchej gleby w przypadku wazonkowcowatych (11). Pierwszą porcję pożywienia należy wymieszać z glebą bezpośrednio przed dodaniem badanych organizmów. Zaleca się stosowanie tego samego rodzaju pożywienia co w przypadku hodowli (zob. dodatek 5).

Światło i temperatura

37. Badania należy przeprowadzać w warunkach kontrolowanego cyklu światło/ciemność 16/8 godzin, z zalecanym natężeniem światła na obszarze z naczyniami do badania na poziomie 400-800 luksów (3). Temperatura przeprowadzania badania powinna wynosić 20 ± 2 °C przez cały czas trwania badania.

Badane stężenia

38. Stosuje się jedno stężenie. Sytuacje, w których wymagane jest dodatkowe stężenie lub stężenia, należy uzasadnić. Jeśli toksyczność (ECx) badanej substancji chemicznej jest zbliżona do analitycznej granicy wykrywalności, zaleca się stosowanie badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo z wysokim poziomem promieniotwórczości właściwej. W przypadku metali stężenie powinno być wyższe niż poziom naturalnego tła w tkankach i glebie.

Replikaty

39. Minimalna liczba naczyń stanowiących replikaty poddanych działaniu substancji na potrzeby pomiarów kinetycznych (etap absorpcji i eliminacji) powinna wynosić trzy na jeden punkt pobierania próbek. Całkowita liczba przygotowanych replikatów powinna być wystarczająca, by objąć wszystkie pobrania próbek podczas etapu absorpcji i eliminacji.

40. Na potrzeby obserwacji biologicznych i pomiarów (np. stosunek masy suchej do masy mokrej, zawartość lipidów) oraz na potrzeby analizy stężeń tła w organizmach i glebie, należy zapewnić co najmniej 12 naczyń stanowiących replikaty kontroli ujemnej (cztery pobrane na początku i cztery na koniec etapu absorpcji, oraz cztery pobrane na koniec etapu eliminacji), jeśli nie zastosowano rozpuszczalnika innego niż woda. Jeśli do zastosowania badanej substancji chemicznej wykorzystano środek rozpuszczający, oprócz replikatów poddanych działaniu substancji należy zapewnić kontrolę rozpuszczalnika obejmującą wszystkie składniki prócz jednostki badanej (na początku etapu absorpcji należy pobrać próbki z czterech naczyń stanowiących replikaty oraz cztery próbki na koniec etapu absorpcji i cztery na koniec etapu eliminacji). W takim przypadku można zapewnić także cztery dodatkowe naczynia stanowiące replikaty kontroli ujemnej (bez rozpuszczalnika) na potrzeby opcjonalnego pobierania próbek na koniec etapu absorpcji. Takie replikaty można porównać pod kątem parametrów biologicznych z kontrolą rozpuszczalnika w celu uzyskania informacji na temat możliwego wpływu rozpuszczalnika na organizmy badane. Zaleca się zapewnienie wystarczającej liczby dodatkowych rezerwowych naczyń stanowiących replikaty (np. ośmiu) na potrzeby poddawania działaniu substancji i kontroli.

▼M4

Częstotliwość pomiarów jakości gleby

41. pH gleby, zawartość wilgoci w glebie oraz jej temperaturę (stałą) w pomieszczeniu badawczym należy mierzyć na początku i na końcu etapu absorpcji i etapu eliminacji. Raz na tydzień należy skontrolować zawartość wilgoci w glebie poprzez zważenie naczyń do badania oraz porównanie faktycznych mas z początkowymi masami na początku badania. Straty wody należy uzupełniać poprzez dodanie dejonizowanej wody.

Pobieranie próbek oraz analiza organizmów i gleby

42. Przykładowy harmonogram etapów absorpcji i eliminacji w badaniach bioakumulacji z wykorzystaniem dżdżownic i wazonkowcowatych przedstawiono w dodatku 3.

43. Próbki gleby pobiera się z naczyń do badania w celu określenia stężenia badanej substancji chemicznej przed dodaniem organizmów, a także podczas etapu absorpcji i etapu eliminacji. Podczas badania określa się stężenia badanej substancji chemicznej w organizmach i glebie. Zasadniczo mierzy się całkowite stężenia w glebie. Opcjonalnie można dokonać pomiaru stężeń w wodzie porowej. W takim przypadku należy przed rozpoczęciem badania przedstawić uzasadnienie i odpowiednie metody oraz takie informacje należy uwzględnić także w sprawozdaniu.

44. Próbki organizmów i gleby pobiera się co najmniej sześć razy podczas etapu absorpcji i eliminacji. Jeśli wykazano stabilność badanej substancji chemicznej, liczbę analiz gleby można zmniejszyć. Zaleca się analizowanie co najmniej trzech replikatów na początku i na końcu etapu absorpcji. Jeśli stężenie w glebie mierzone na końcu etapu absorpcji różni się od stężenia początkowego o ponad 30 %, próbki gleby pobrane w innych datach należy również poddać analizie.

45. Za każdym razem przy pobieraniu próbek należy usunąć z gleby organizmy znajdujące się w danym replikacie (np. przez wyłożenie gleby z replikatu na płytką tackę i wyjęcie organizmów za pomocą miękkiej pęsety jubilerskiej), a następnie opłukać je szybko w wodzie na płytkiej szklanej lub metalowej tacce. Należy usunąć nadmiar wody (zob. pkt 34). Następnie należy ostrożnie przenieść organizmy do zważonego uprzednio naczynia i od razu je zważyć, wraz z zawartością układu pokarmowego.

46. Dżdżownicom (*Eisenia* sp.) należy umożliwić wypróżnienie się przez noc, np. na wilgotnej bibule filtracyjnej na przykrytych szalkach Petriego (zob. pkt 34). Gdy dżdżownice się wypróżnią, należy określić masę organizmów w celu dokonania oceny ewentualnego spadku biomasy podczas badania (zob. kryteria ważności opisane w pkt 17). Ważenie i analizę tkanek wazonkowcowatych przeprowadza się bez etapu wypróżniania, jako że jest to technicznie trudne z uwagi na mały rozmiar tych organizmów. Po końcowym określeniu masy organizmy należy niezwłocznie uśmiercić, za pomocą najbardziej odpowiedniej metody (np. używając ciekłego azotu lub zamrażając je w temperaturze poniżej -18 °C).

47. Podczas etapu eliminacji organizmy wymieniają zanieczyszczoną zawartość układu pokarmowego na czystą glebę. Oznacza to, że pomiary próbek pobranych z organizmów bez wypróżnienia (w tym przypadku wazonkowcowatych) bezpośrednio przed etapem eliminacji zawierają zanieczyszczoną glebę z układu pokarmowego. W przypadku skąposzczetów wodnych zakłada się, że większość zanieczyszczonej zawartości układu pokarmowego zostaje zastąpiona czystym osadem po początkowym okresie etapu eliminacji trwającym 4–24 godziny, np. (46). Podobne ustalenia odnotowano w przypadku dżdżownic w badaniach dotyczących akumulacji znakowanego izotopowo kadmu i cynku (78). W przypadku wazonkowcowatych bez wypróżnienia jako stężenie w tkance po wypróżnieniu można przyjąć stężenie pierwszej próbki pobranej podczas etapu eliminacji. Aby uwzględnić rozcieńczenie stężenia jednostki badanej przez niezanieczyszczoną glebę podczas etapu eliminacji, masę zawartości układu pokarmowego można oszacować na podstawie stosunku masy mokrej organizmu/masy popiołu z organizmu lub masy suchej organizmów/masy popiołu z organizmu.

▼M4

48. Próbki gleby i organizmów należy poddać analizie niezwłocznie po usunięciu organizmów (tj. w ciągu 1-2 dni), aby zapobiec rozkładowi lub innym stratom, a także zaleca się obliczenie przybliżonej szybkości absorpcji i eliminacji w trakcie trwania badania. Jeśli analizę wykonuje się z opóźnieniem, próbki należy przechowywać z zastosowaniem odpowiedniej metody, np. głębokiego zamrażania (≤ -18 °C).

49. Należy sprawdzić, czy dokładność i odtwarzalność analizy chemicznej, a także odzysk badanej substancji chemicznej z próbek gleby i organizmów są zadowalające dla danej metody. Należy odnotować efektywność ekstrakcji, granicę wykrywalności oraz granicę oznaczalności. Należy także sprawdzić, czy badana substancja chemiczna nie jest wykrywalna w naczyniach kontrolnych w stężeniach wyższych niż tło. Jeśli stężenie badanej substancji chemicznej w organizmie badanym Ca wynosi > 0 w organizmach kontrolnych, należy to uwzględnić przy obliczaniu parametrów kinetycznych (zob. dodatek 2). Przez cały okres trwania badania wszystkimi próbkami należy posługiwać się w taki sposób, by zminimalizować ich zanieczyszczenie i straty (np. wynikające z adsorpcji badanej substancji chemicznej na przyrządzie do pobierania próbek).

50. W przypadku zastosowania badanych substancji chemicznych znakowanych izotopowo możliwe jest przeprowadzenie analizy macierzystej substancji chemicznej i metabolitów. Określenie ilościowe macierzystej badanej substancji chemicznej i metabolitów w stanie ustalonym lub na koniec etapu absorpcji dostarcza ważnych informacji. Próbki powinny wtedy być „oczyszczone", aby macierzysta badana substancja chemiczna mogła zostać osobno określona ilościowo. Jeśli poszczególne metabolity przekraczają 10 % całkowitej promieniotwórczości w analizowanej próbce lub próbkach, zaleca się określenie takich metabolitów.

51. Odzysk całkowity, oraz odzysk badanej substancji chemicznej w organizmach, glebie a także, jeśli zastosowano, w pułapkach zawierających absorbenty umożliwiające zatrzymanie odparowującej badanej substancji chemicznej, należy odnotować i przedstawić w sprawozdaniu.

52. Łączne traktowanie osobników pochodzących z konkretnego naczynia do badania jest dopuszczalne w przypadku organizmów z rodziny wazonkowcowatych, które są mniejsze niż dżdżownice. Jeśli takie łączenie obejmuje zmniejszenie liczby replikatów, ogranicza to statystyczne procedury, jakie można zastosować do danych. Jeśli wymagana jest konkretna procedura i moc statystyczna, należy w badaniu zastosować odpowiednią liczbę naczyń do badania stanowiących replikaty, w celu uwzględnienia pożądanego łączenia, procedury i mocy.

53. Zaleca się, by współczynnik bioakumulacji był wyrażony zarówno jako funkcja całkowitej masy suchej oraz, w razie konieczności (np. w przypadku wysoce hydrofobowych substancji chemicznych), jako funkcja zawartości lipidów. Do określenia zawartości lipidów należy zastosować odpowiednie metody (w tym celu należy dostosować istniejące metody, np. (31) (58)). W ramach takich metod stosuje się technikę ekstrakcji z wykorzystaniem chloroformu/metanolu. W celu uniknięcia jednak rozpuszczalników chlorowanych należy zastosować zmodyfikowaną metodę Bligha i Dyera (9) zgodnie z opisem w (17). Jako że w wyniku zastosowania różnych metod można uzyskać różniące się wartości, ważne jest podanie szczegółowych informacji na temat zastosowanej metody. Jeśli jest to możliwe, tj. jeśli jest dostępna wystarczająca ilość tkanki organizmów, analizę lipidów należy przeprowadzić z użyciem tej samej próbki lub ekstraktu, których użyto do analizy badanej substancji chemicznej, jako że lipidy często muszą zostać usunięte z ekstraktu przed analizą za pomocą chromatografii (49). Do pomiaru zawartości lipidów można również wykorzystać zwierzęta kontrolne, a wartości dotyczące zawartości lipidów mogą następnie zostać wykorzystane do normalizowania wartości współczynnika bioakumulacji. Przy zastosowaniu tego drugiego podejścia ogranicza się zanieczyszczenie przyrządów badaną substancją chemiczną.

▼M4

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

54. Krzywą absorpcji badanej substancji chemicznej uzyskuje się poprzez wykreślenie jej stężenia w/na organizmach podczas etapu absorpcji w czasie w skali arytmetycznej. Kiedy krzywa osiągnie plateau lub stan ustalony (zob. definicje w dodatku 1), współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym oblicza się na podstawie:

$$\frac{C_a \text{ w stanie ustalonym lub na końcu etapu absorpcji (średnia)}}{C_s \text{ w stanie ustalonym lub na końcu etapu absorpcji (średnia)}}$$

C_a stanowi stężenie badanej substancji chemicznej w organizmie badanym.

C_s stanowi stężenie badanej substancji chemicznej w glebie.

55. W przypadku nieosiągnięcia stanu ustalonego kinetyczny współczynnik akumulacji (BAFK), oparty na stałych szybkości, należy określić na podstawie współczynnika bioakumulacji w stanie równowagi zgodnie z poniższym opisem:

— należy określić współczynnik akumulacji (BAF_K) jako stosunek k_s/k_e,

— szybkość absorpcji i eliminacji najlepiej obliczyć jednocześnie (zob. równanie 11 w dodatku 2),

— stałą szybkości eliminacji (k_e) określa się zazwyczaj na podstawie krzywej eliminacji (tj. wykresu stężenia jednostki badanej w organizmach podczas etapu eliminacji). Stałą szybkości absorpcji k_s oblicza się następnie na podstawie takiego k_e oraz wartości C_a, którą uzyskuje się z krzywej absorpcji – zob. opis tych metod w dodatku 2. Preferowaną metodą uzyskania kinetycznego współczynnika akumulacji oraz stałych szybkości, k_s i k_e jest zastosowanie nieliniowych komputerowych metod estymacji parametrycznej. Jeśli w sposób ewidentny eliminacja nie jest procesem pierwszego rzędu, należy zastosować bardziej złożone modele.

Sprawozdanie z badania

56. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— wszelkie dostępne informacje na temat toksyczności ostrej lub przewlekłej (np. EC_x, LC_x, NOEC) badanej substancji chemicznej w odniesieniu do żyjących w glebie skąposzczetów,

— czystość, cechy fizyczne i właściwości fizykochemiczne, np. współczynnik podziału oktanol/woda, rozpuszczalność w wodzie,

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej; źródło jednostki badanej, nazwę i stężenie wszelkich zastosowanych rozpuszczalników,

— w przypadku zastosowania badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo, dokładne położenie znakowanych atomów, promieniotwórczość właściwą oraz czystość radiochemiczną.

Badane gatunki

— nazwę naukową, szczep, źródło, wszelkie przypadki wcześniejszego poddania działaniu, aklimatyzację, wiek, rozmiar-zakres itp.

▼M4

Warunki badania

— zastosowaną procedurę badania,

— rodzaj i charakterystykę zastosowanego oświetlenia i jego cykl lub cykle,

— projekt badania (np. liczbę i rozmiar naczyń do badania, masę gleby i wysokość warstwy gleby, liczbę replikatów, liczbę organizmów w każdym replikacie, liczbę badanych stężeń, czas trwania etapu absorpcji i eliminacji, częstotliwość pobierania próbek),

— uzasadnienie wyboru materiału, z którego wykonano naczynia do badania,

— metodę przygotowania i zastosowania jednostki badanej, a także uzasadnienie wyboru konkretnej metody,

— badane stężenia nominalne, średnie mierzonych wartości oraz ich odchylenia standardowe w naczyniach do badania, a także metodę uzyskania takich wartości,

— źródło składników gleby sztucznej lub – w przypadku zastosowania gleb naturalnych – pochodzenie gleby, opis wszelkich wcześniejszych procesów, jakim została poddana, wyniki kontroli (przeżycie, rozwój biomasy, rozmnażanie), charakterystykę gleby (pH, całkowitą zawartość węgla organicznego, rozkład wielkości cząstek (procent piasku, iłu i gliny), maksymalną zdolność zatrzymywania wody, procentową zawartość wilgoci na początku i na końcu badania, oraz wszelkie inne dokonane pomiary),

— szczegółowe informacje na temat traktowania próbek gleby i organizmów, w tym szczegółowe informacje na temat procedur przygotowania, przechowywania, wzbogacania, ekstrakcji oraz procedur analitycznych (oraz precyzji) zastosowanych w odniesieniu do jednostki badanej w organizmach i glebie, oraz zawartość lipidów (jeśli zmierzono), a także odzysk jednostki badanej.

Wyniki

— śmiertelność organizmów kontrolnych i organizmów w każdym naczyniu do badania oraz wszelkie zaobserwowane niestandardowe zachowania (np. unikanie gleby, nierozmnażanie się w badaniu bioakumulacji z wykorzystaniem wazonkowcowatych),

— stosunek masy suchej do masy mokrej gleby i organizmów badanych (przydatne do normalizacji),

— masy mokre organizmów przy każdym pobieraniu próbek; w przypadku dżdżownic masy mokre na początku badania oraz przy każdym pobieraniu próbek, przed wypróżnieniem się i po wypróżnieniu się organizmów,

— zawartość lipidów w organizmach badanych (jeśli ustalono),

— krzywe, pokazujące kinetykę absorpcji i eliminacji badanej substancji chemicznej w organizmach, oraz okres czasu konieczny do osiągnięcia stanu ustalonego,

— C_a i C_s (wraz z odchyleniem standardowym i zakresem, w stosownych przypadkach) dla wszystkich przypadków pobierania próbek (C_a wyrażone jako g kg^{-1} mokrej i suchej masy całego ciała, a C_s wyrażone jako g kg^{-1} mokrej i suchej masy gleby). Jeśli wymagany jest współczynnik akumulacji biota-gleba (np. na potrzeby porównania wyników z dwóch lub większej liczby badań przeprowadzonych z wykorzystaniem zwierząt o różnej zawartości lipidów), C_a można dodatkowo wyrazić jako g kg^{-1} zawartości lipidów organizmu, a C_s jako g kg^{-1} węgla organicznego w glebie,

— współczynnik bioakumulacji (wyrażony jako kg gleby·kg^{-1} organizmu), stałą szybkości absorpcji gleby k_s (wyrażoną jako g gleby kg^{-1} organizmu $dzień^{-1}$), stałą szybkości eliminacji k_e (wyrażoną w $dzień^{-1}$); współczynnik akumulacji biota-gleba (wyrażony jako kg węgla organicznego w glebie kg^{-1} zawartość lipidów w organizmach) należy również przedstawić w sprawozdaniu,

▼M4

— jeśli zmierzono: procent macierzystej substancji chemicznej, metabolitów oraz związanych substancji resztkowych (tj. procent badanej substancji chemicznej, która nie może zostać poddana ekstrakcji za pomocą powszechnych metod ekstrakcji) wykryte w glebie i zwierzętach badanych,

— metody statystyczne zastosowane do analizy danych.

Ocena wyników

— zgodność wyników z kryteriami ważności wymienionymi w pkt 17,

— nieoczekiwane lub niestandardowe wyniki, np. niepełna eliminacja badanej substancji chemicznej ze zwierząt badanych.

BIBLIOGRAFIA:

(1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Praca magisterska, Uniwersytet w Coimbrze.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów (ASTM), 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: 26 s.

(4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. W: Hutzinger, O. (red.), The Handbook of Environmental Chemistry, t. 2 część J (t. red.: 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 i 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, Paris, 671 s.

(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 nr: 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 i 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 i 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, w: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (red.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, s. 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) Rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH), utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE i rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE (Dz.U. L 396 z 30.12.2006, s. 1).

(20) Edwards CA i Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. wydanie trzecie, Chapman & Hall, Londyn, 426 s.

(21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paryż.

(22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th i 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). Sprawozdanie dla federalnej agencji środowiskowej (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D nr: 204 67 458: 149 s. Dostępne do pobrania pod adresem: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N i 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: 57 s.

(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) Prokuratura Europejska (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). Praca naukowa, Uniwersystet w Moguncji, 156 s.

▼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 i Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.

(33) Hund-Rinke K i 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. (red.), 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. Praca naukowa, uniwersytet w Monachium, 137 s.

(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, w: R. Nagel and R. Loskill (red.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Rozdział C.8 niniejszego załącznika. Toksyczność dla dżdżownic.

(49) Rozdział C.13 niniejszego załącznika. Biokoncentracja: badanie ryb w warunkach przepływu.

(50) Rozdział C.21 niniejszego załącznika. Mikroorganizmy żyjące w glebie: badanie przemian azotu.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paryż.

(52) Oecd (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paryż.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paryż.

(54) .Petersen H i 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: 373 s.

(61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, w: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (red.). 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 i 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 i Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims R W i Gerard BM (1985). Earthworms, w: 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 i 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. w: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (red.). 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 i 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, w: Ecotoxicology of Earthworms (red. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel CA i 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 i 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 i Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

Dodatek 1

DEFINICJE

Bioakumulacja to wzrost stężenia badanej substancji chemicznej w organizmie lub na organizmie w stosunku do stężenia badanej substancji chemicznej w otaczającym środowisku. Bioakumulacja wynika zarówno z procesu biokoncentracji, jak i z procesu biomagnifikacji (zob. poniżej).

Biokoncentracja to wzrost stężenia badanej substancji chemicznej w/na organizmie, wynikający z absorpcji substancji chemicznej wyłącznie z otaczającego środowiska (np. poprzez powierzchnię ciała oraz spożytą glebę), w stosunku do stężenia badanej substancji chemicznej w otaczającym środowisku.

Biomagnifikacja to wzrost stężenia badanej substancji chemicznej w/na organizmie, wynikający głównie ze absorpcji zanieczyszczonego pożywienia lub żeru, w stosunku do stężenia badanej substancji chemicznej w takim pożywieniu lub żerze. Biomagnifikacja może prowadzić do przeniesienia lub akumulacji jednostki badanej w ramach sieci pokarmowych.

Eliminacja badanej substancji chemicznej stanowi stratę takiej substancji chemicznej z tkanki badanego organizmu w drodze czynnych lub biernych procesów, przy czym taka strata zachodzi niezależnie od obecności lub braku jednostki badanej w otaczającym środowisku.

Współczynnik bioakumulacji (BAF) w dowolnym momencie podczas etapu absorpcji w trakcie opisanego tu badania bioakumulacji stanowi stężenie badanej substancji chemicznej w/na badanym organizmie (C_a wyrażone w $g \cdot kg^{-1}$ suchej masy organizmu) podzielone przez stężenie substancji chemicznej w otaczającym środowisku (C_s wyrażone jako $g \cdot kg^{-1}$ suchej masy gleby); współczynnik bioakumulacji wyraża się w jednostkach kg gleby$\cdot kg^{-1}$ organizmu.

Współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym (BAF_{ss}) to współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym, który nie zmienia się w znaczący sposób przez długi okres czasu, a stężenie badanej substancji chemicznej w otaczającym środowisku (C_s wyrażane jako $g.kg^{-1}$ suchej masy gleby) jest podczas tego okresu stałe.

Współczynniki bioakumulacji obliczane bezpośrednio na podstawie stosunku stałej szybkości absorpcji gleby do stałej szybkości eliminacji (k_s oraz k_e, zob. poniżej) nazywa się kinetycznymi współczynnikami bioakumulacji (BAF_K).

Współczynnik akumulacji biota-gleba (BSAF) stanowi stężenie badanej substancji chemicznej o znormalizowanym poziomie lipidów w/na organizmie badanym, podzielone przez stężenie badanej substancji chemicznej o znormalizowanym poziomie węgla organicznego w glebie w stanie ustalonym. C_a w takim przypadku wyraża się jako $g \cdot kg^{-1}$ zawartości lipidów w organizmie, a C_s jako $g \cdot kg^{-1}$ zawartości węgla organicznego w glebie; współczynnik akumulacji biota-gleba wyraża się w kg węgla organicznego$\cdot kg^{-1}$ lipidów.

Plateau lub **stan ustalony** określa się jako równowagę między procesem absorpcji a procesem eliminacji, które zachodzą równolegle podczas etapu narażenia. Stan ustalony zostaje osiągnięty na wykresie współczynnika bioakumulacji w czasie w momencie, kiedy krzywa staje się równoległa do osi czasu, a trzy następujące po sobie analizy współczynnika bioakumulacji, wykonane na próbkach pobranych w odstępach co najmniej dwóch dni, różnią się od siebie nie więcej niż w 20 % i między trzema okresami pobierania próbek nie ma statystyczne istotnych różnic. W przypadku badanych substancji chemicznych, które wolno ulegają absorpcji, bardziej odpowiednie będą odstępy czasowe wynoszące siedem dni (49).

Współczynnik podziału węgiel organiczny-woda (K_{oc}) to stosunek stężenia substancji chemicznej w/na frakcji węgla organicznego gleby i stężenia substancji chemicznej w wodzie w warunkach równowagi.

Współczynnik podziału oktanol-woda (K_{ow}) jest to stosunek rozpuszczalności substancji chemicznej w n-oktanolu i wodzie w warunkach równowagi, określany czasami także jako P_{ow}. Logarytm K_{ow} ($\log_{Kow}$) wykorzystuje się jako wskaźnik zdolności substancji chemicznej do bioakumulacji w organizmach wodnych.

▼M4

Etap absorpcji lub narażenia to czas, w trakcie którego organizmy badane poddaje się narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej.

Stała szybkości absorpcji gleby (k_s) stanowi wartość liczbową określającą szybkość wzrostu stężenia jednostki badanej w/na organizmie badanym, wynikającego z etapu absorpcji substancji z gleby. k_s wyraża się jako g gleby kg^{-1} organizmu d^{-1}.

Etap eliminacji to czas następujący po przeniesieniu organizmów badanych z zanieczyszczonego środowiska do środowiska niezawierającego jednostki badanej, kiedy to bada się eliminację (lub stratę netto) substancji chemicznej z organizmów badanych.

Stała szybkości eliminacji (k_e) stanowi wartość liczbową określającą szybkość zmniejszania się stężenia jednostki badanej w/na organizmie badanym, po przeniesieniu organizmów badanych ze środowiska zawierającego jednostkę badaną do środowiska niezawierającego danej substancji chemicznej; k_e wyraża się jako d^{-1}.

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M4

Dodatek 2

Obliczanie parametrów absorpcji i eliminacji

Głównym punktem końcowym badania bioakumulacji jest współczynnik bioakumulacji. Zmierzony współczynnik bioakumulacji można obliczyć poprzez podzielenie stężenia w organizmie badanym, C_a, przez stężenie w glebie, C_s, w stanie ustalonym. Jeśli podczas etapu absorpcji nie osiągnięto stanu ustalonego, oblicza się kinetyczny współczynnik bioakumulacji na podstawie stałych szybkości zamiast współczynnika bioakumulacji w stanie ustalonym. Należy jednak zwrócić uwagę, czy współczynnik bioakumulacji jest oparty na stężeniach w stanie ustalonym, czy też nie.

Kinetyczny współczynnik bioakumulacji, stałą szybkości absorpcji (k_s) i stałą szybkości eliminacji (k_e) uzyskuje się zazwyczaj poprzez zastosowanie komputerowych, nieliniowych metod estymacji parametrycznej, np. na podstawie modeli opisanych w (68). Jeśli przyjąć zestaw danych dotyczących czasu sekwencyjnego stężenia i równania modelowe:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[równanie 1]}$$

lub

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[równanie 2]}$$

gdzie:

C_a = stężenie substancji chemicznej w organizmach [g kg-1 masy mokrej lub suchej],

k_s = stała szybkości absorpcji w tkance [g gleby kg-1 organizmu d-1],

C_s = stężenie substancji chemicznej w glebie [g kg-1 masy mokrej lub suchej],

k_e = stała szybkości eliminacji [d-1],

t_c = czas na koniec etapu absorpcji,

takie programy komputerowe obliczają wartości dla kinetycznego współczynnika bioakumulacji, k_s i k_e.

Gdy stężenie tła w organizmach nienarażonych na działanie substancji, np. w dniu 0, różni się znacznie od zera (taka sytuacja może pojawić się na przykład w przypadku metali), takie stężenie tła ($C_{a,0}$) należy uwzględnić w takich równaniach, aby wyglądały one następująco:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[równanie 3]}$$

oraz

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[równanie 4]}$$

W przypadku zaobserwowania podczas etapu absorpcji znaczącego spadku w czasie stężenia badanej substancji chemicznej w glebie, należy zastosować następujące modele, np. (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k0^{t}}) \qquad \text{[równanie 5]}$$

▼M4

gdzie:

C_s = stężenie substancji chemicznej w glebie [g kg-1 masy mokrej lub suchej],

k_0 = stała szybkości rozkładu w glebie [d-1],

C_0 = początkowe stężenie substancji chemicznej w glebie [g kg-1 masy mokrej lub suchej].

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[równanie 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[równanie 7]}$$

gdzie:

C_a = stężenie substancji chemicznej w organizmach [g kg-1 masy mokrej lub suchej],

k_s = stała szybkości absorpcji w tkance [g gleby kg-1 organizmu d-1],

k_0 = stała szybkości rozkładu w glebie [d-1],

k_e = stała szybkości eliminacji [d-1],

t_c = czas na koniec etapu absorpcji.

W przypadku osiągnięcia podczas etapu absorpcji stanu ustalonego (tj. $t = \infty$) równanie 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[równanie 1]}$$

można zredukować do:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

lub

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[równanie 8]}$$

Stężenie jednostki badanej w tkance organizmu w stanie ustalonym ($C_{a,ss}$) oblicza się wtedy za pomocą k_s/k_e x C_s.

Współczynnik akumulacji biota-gleba można obliczyć w następujący sposób:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[równanie 9]}$$

gdzie f_{oc} stanowi frakcję węgla organicznego w glebie, a f_{lip} frakcję lipidów w organizmie, przy czym wartości te należy określić na podstawie próbek pobranych z badania oraz, odpowiednio, na podstawie masy suchej lub mokrej.

Kinetykę eliminacji można modelować za pomocą danych z etapu eliminacji oraz poprzez zastosowanie następującego modelu równania oraz komputerowej, nieliniowej metody estymacji parametrycznej. Jeśli dane pomiarowe wykreślone w czasie wskazują na stały wykładniczy spadek stężenia jednostki badanej w zwierzętach, do opisania przebiegu eliminacji w czasie można zastosować model jednoprzedziałowy (równanie 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[równanie 10]}$$

▼M4

Procesy eliminacji czasami okazują się dwufazowe, wykazując szybki spadek C_a na wczesnych etapach, który zmienia się w wolniejszą stratę jednostek badanych na późniejszych etapach eliminacji, np. (27) (68). Takie dwa etapy można interpretować, zakładając, że w organizmie istnieją dwa różne przedziały, z których jednostka badana jest eliminowana z różną szybkością. W takich przypadkach należy przeanalizować odnośną literaturę, np. (38) (39) (40) (78).

Przy zastosowaniu modeli równań przedstawionych powyżej parametry kinetyczne (k_s i k_e) można obliczyć również za jednym razem, stosując model kinetyki reakcji pierwszego rzędu do wszystkich danych z etapu absorpcji i eliminacji jednocześnie. Aby poznać opis metody, która pozwala na takie połączone obliczanie stałych szybkości absorpcji i eliminacji, można zapoznać się z pozycjami w bibliografii (41), (73) i (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[równanie 11]}$$

Uwaga: Jeśli parametry absorpcji i eliminacji szacuje się jednocześnie na podstawie połączonych danych z etapu absorpcji i eliminacji, „m” w równaniu 11 stanowi deskryptor, który umożliwia programowi komputerowemu przypisanie pod-terminów równania do zestawów danych z odpowiedniego etapu oraz poprawne przeprowadzenie oceny (m = 1 dla etapu absorpcji, m = 2 dla etapu eliminacji).

Niemniej jednak takie modele równań należy stosować z ostrożnością, zwłaszcza jeśli podczas badania zachodzą zmiany w biodostępności badanej substancji chemicznej, biodegradacja lub rozkład (zob. np. (79)).

▼M4

Dodatek 3

PRZYKŁADOWE HARMONOGRAMY BADAŃ BIOAKUMULACJI W GLEBIE

Badanie z wykorzystaniem dżdżownic

a) Etap absorpcji z pobieraniem próbek w 8 datach na potrzeby obliczenia kinetyki

Dzień	Czynność
–6	kondycjonowanie przygotowanej gleby przez 48 godzin;
–4	wzbogacenie frakcji gleby roztworem substancji chemicznej; odparowanie wszelkich rozpuszczalników; wymieszanie składników gleby; rozprowadzenie gleby do naczyń do badania; osiąganie równowagi w warunkach badania – 4 dni (3 tygodnie w przypadku gleby wzbogaconej metalem);
–3 do –1	oddzielenie organizmów badanych od kultury w celu ich aklimatyzacji; przygotowanie i nawilżenie składników gleby;
0	pomiar temperatury i pH gleby; usunięcie próbek gleby z naczyń poddawanych działaniu substancji oraz kontroli rozpuszczalnika w celu określenia stężenia badanej substancji chemicznej; dodanie porcji pożywienia; zważenie i randomizowane rozprowadzenie organizmów do naczyń do badania; zachowanie wystarczającej liczby podpróbek organizmów na potrzeby określenia analitycznych wartości dotyczących tła, masy mokrej i suchej oraz zawartości lipidów; zważenie wszystkich naczyń do badania w celu kontrolowania wilgotności gleby; skontrolowanie dopływu powietrza, jeśli stosuje się zamknięty system badania;
1	skontrolowanie dopływu powietrza, odnotowanie zachowań organizmów i temperatury; pobranie próbek gleby i organizmów w celu określenia stężenia jednostki badanej;
2	takie jak w dniu 1;
3	skontrolowanie dopływu powietrza, zachowań organizmów i temperatury;
4	takie jak w dniu 1;
5–6	takie jak w dniu 3;
7	takie jak w dniu 1; dodanie porcji pożywienia; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania oraz uzupełnienie odparowanej wody;
8–9	takie jak w dniu 3;
10	takie jak w dniu 1;
11–13	takie jak w dniu 3;
14	takie jak w dniu 1; dodanie porcji pożywienia; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania oraz uzupełnienie odparowanej wody;
15–16	takie jak w dniu 3;
17	takie jak w dniu 1;
18–20	takie jak w dniu 3;

▼**M4**

Dzień	Czynność
21	takie jak w dniu 1; pomiar temperatury i pH gleby; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania; koniec etapu absorpcji; przeniesienie organizmów z pozostałych poddawanych narażeniu replikatów do naczyń zawierających czystą glebę w celu rozpoczęcia etapu eliminacji (bez wypróżniania się organizmów); pobranie próbek gleby i organizmów z kontroli rozpuszczalnika.
	Czynności wykonywane przed narażeniem (etap osiągania równowagi) należy zaplanować w czasie, uwzględniając właściwości badanej substancji chemicznej.
	Czynności opisane dla dnia 3 należy wykonywać codziennie (przynajmniej w dni robocze).

b) Etap eliminacji

Dzień	Czynność
–6	przygotowanie i nawilżenie składników gleby; kondycjonowanie przygotowanej gleby przez 48 godzin;
–4	wymieszanie składników gleby; rozprowadzenie gleby do naczyń do badania; inkubacja w warunkach badania przez 4 dni;
0 (koniec etapu absorpcji)	pomiar temperatury i pH gleby; ważenie i randomizowane rozprowadzenie organizmów do naczyń do badania; dodanie porcji pożywienia; przeniesienie organizmów z pozostałych poddawanych narażeniu replikatów do naczyń zawierających czystą glebę; pobranie próbek gleby i organizmów po 4–6 godzinach w celu określenia stężenia badanej substancji chemicznej;
1	skontrolowanie dopływu powietrza, odnotowanie zachowań organizmów i temperatury; pobranie próbek gleby i organizmów w celu określenia stężenia badanej substancji chemicznej;
2	takie jak w dniu 1;
3	skontrolowanie dopływu powietrza, zachowań organizmów i temperatury;
4	takie jak w dniu 1;
5–6	takie jak w dniu 3;
7	takie jak w dniu 1; dodanie porcji pożywienia; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania oraz uzupełnienie odparowanej wody;
8–9	takie jak w dniu 3;
10	takie jak w dniu 1;
11–13	takie jak w dniu 3;
14	takie jak w dniu 1; dodanie porcji pożywienia; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania oraz uzupełnienie odparowanej wody;
15–16	takie jak w dniu 3;
17	takie jak w dniu 1;

▼M4

Dzień	Czynność
18–20	takie jak w dniu 3;
21	takie jak w dniu 1; pomiar temperatury i pH gleby; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania; pobranie próbek gleby i organizmów z kontroli rozpuszczalnika.
	Przygotowanie gleby przed rozpoczęciem etapu eliminacji należy przeprowadzać w taki sam sposób, w jaki miało to miejsce w przypadku etapu absorpcji.
	Czynności opisane dla dnia 3 należy wykonywać codziennie (przynajmniej w dni robocze).

Badanie z wykorzystaniem wazonkowcowatych

a) Etap absorpcji z pobieraniem próbek w 8 datach na potrzeby obliczenia kinetyki

Dzień	Czynność
–6	kondycjonowanie przygotowanej gleby przez 48 godzin;
–4	wzbogacanie frakcji gleby roztworem substancji chemicznej; odparowanie wszelkich rozpuszczalników; wymieszanie składników gleby; rozprowadzenie gleby do naczyń do badania; osiąganie równowagi w warunkach badania – 4 dni (3 tygodnie w przypadku gleby wzbogaconej metalem);
–3 do –1	oddzielenie organizmów badanych od kultury w celu ich aklimatyzacji; przygotowanie i nawilżenie składników gleby;
0	pomiar temperatury i pH gleby; usunięcie próbek gleby z naczyń poddawanych działaniu substancji oraz kontroli rozpuszczalnika w celu określenia stężenia badanej substancji chemicznej; dodanie porcji pożywienia; zważenie i randomizowane rozprowadzenie organizmów do naczyń do badania; zachowanie wystarczającej liczby podpróbek organizmów na potrzeby określenia analitycznych wartości dotyczących tła, masy mokrej i suchej oraz zawartości lipidów; zważenie wszystkich naczyń do badania w celu kontrolowania wilgotności gleby; skontrolowanie dopływu powietrza, jeśli stosuje się zamknięty system badania;
1	skontrolowanie dopływu powietrza, odnotowanie zachowań organizmów i temperatury; pobranie próbek gleby i organizmów w celu określenia stężenia jednostki badanej;
2	takie jak w dniu 1;
3	skontrolowanie dopływu powietrza, zachowań organizmów i temperatury;
4	takie jak w dniu 1;
5–6	takie jak w dniu 3;
7	takie jak w dniu 1; dodanie porcji pożywienia; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania oraz uzupełnienie odparowanej wody;
9	takie jak w dniu 1;
10	takie jak w dniu 3;

▼**M4**

Dzień	Czynność
11	takie jak w dniu 1;
12–13	takie jak w dniu 3;
14	takie jak w dniu 1; dodanie porcji pożywienia; pomiar temperatury i pH gleby; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania; koniec etapu absorpcji; przeniesienie organizmów z pozostałych poddawanych narażeniu replikatów do naczyń zawierających czystą glebę w celu rozpoczęcia etapu eliminacji (bez wypróżniania się organizmów); pobranie próbek gleby i organizmów z kontroli rozpuszczalnika.
	Czynności wykonywane przed narażeniem (etap osiągania równowagi) należy zaplanować w czasie, uwzględniając właściwości badanej substancji chemicznej.
	Czynności opisane dla dnia 3 należy wykonywać codziennie (przynajmniej w dni robocze).

▼M4

Dodatek 4

Gleba sztuczna – zalecenia dotyczące jej przygotowania i przechowywania

Jako że gleby naturalne z konkretnego źródła mogą nie być dostępne przez cały rok, a organizmy rodzime oraz obecność mikrozanieczyszczeń mogą mieć wpływ na badanie, w opisanym tu badaniu zaleca się stosowanie podłoża sztucznego, sztucznej gleby zgodnie z rozdziałem C.8 niniejszego załącznika, Toksyczność dla dżdżownic (48). W takiej glebie przeżyć, rozwijać się i rozmnażać może kilka gatunków badanych, a także zapewnia się w ten sposób maksymalną standaryzację oraz porównywalność warunków badania i hodowli w ramach danego laboratorium oraz między laboratoriami.

Składniki gleby

Torf:	10 %	Torf z rozkładu torfowca (Sphagnum), zgodnie z wytyczną OECD nr 207 (48);
Piasek kwarcowy:	70 %	Pprzemysłowy piasek kwarcowy (wysuszony powietrzem); wielkość ziaren: ponad 50 % cząstek powinna mieścić się w przedziale 50–200 μm, ale wszystkie cząstki powinny być ≤ 2 mm;
Glinka kaolinowa:	20 %	Zawartość kaolinitu ≥ 30 %;
Węglan wapnia:	≤ 1 %	$CaCO_3$, sproszkowany, chemicznie czysty.

Opcjonalnie zawartość węgla organicznego w glebie sztucznej można zmniejszyć, np. poprzez obniżenie zawartości torfu do 4–5 % suchej gleby oraz odpowiednie zwiększenie zawartości piasku. Dzięki takiemu zmniejszeniu zawartości węgla organicznego mogą zmniejszyć się możliwości adsorpcji badanej substancji chemicznej do gleby (węgiel organiczny), a dostępność badanej substancji chemicznej dla organizmów może wzrosnąć (74). Wykazano, że gatunki *Enchytraeus albidus* i *Eisenia fetida* mogą spełniać warunki ważności dotyczące rozmnażania, jeśli bada się je w glebach naturalnych o niższej zawartości węgla organicznego, np. 2,7 % (33) (61), oraz istnieją doświadczenia pokazujące, że pozwala na to również zastosowanie gleby sztucznej przy zawartości torfu na poziomie 5 %.

Przygotowanie

Suche składniki gleby dokładnie się miesza (np. w dużym mieszalniku laboratoryjnym). Taką czynność należy przeprowadzić około tygodnia przed rozpoczęciem badania. Wymieszane suche składniki gleby należy nawilżyć dejonizowaną wodą co najmniej 48 godzin przed zastosowaniem badanej jednostki, w celu wyrównania/stabilizacji kwasowości. W celu określenia pH stosuje się mieszaninę gleby i roztworu 1 M KCl w stosunku 1:5. Jeśli wartość pH nie mieści się w wymaganym przedziale (6,0 ± 0,5), do gleby dodaje się odpowiednią ilość $CaCO_3$ lub przygotowuje się nową partię gleby.

Maksymalną zdolność zatrzymywania wody gleby sztucznej określa się zgodnie z ISO 11268-2 (35). Co najmniej dwa dni przed rozpoczęciem badania suchą glebę sztuczną nawilża się poprzez dodanie odpowiedniej ilości wody dejonizowanej lub regenerowanej w celu uzyskania około połowy końcowej zawartości wody. Końcowa zawartość wody powinna wynosić 40–60 % maksymalnej zdolności zatrzymywania wody. Na początku badania uprzednio nawilżoną glebę dzieli się na liczbę partii odpowiadającą liczbie badanych stężeń oraz kontroli zastosowanych w badaniu, a zawartość wilgoci dostosowuje się do poziomu 40–60 % maksymalnej zdolności zatrzymywania wody poprzez zastosowanie roztworu jednostki badanej lub poprzez dodanie wody dejonizowanej lub regenerowanej. Zawartość wilgoci określa się na początku i na końcu badania (przy temperaturze 105 °C). Zawartość wilgoci powinna być optymalna dla wymogów dotyczących danego gatunku (zawartość wilgoci sprawdza się w następujący sposób: jeśli glebę delikatnie ściśnie się w dłoni, między palcami powinny pojawić się kropelki wody).

▼M4

Przechowywanie

Suche składniki gleby sztucznej można, do czasu ich wykorzystania, przechowywać w temperaturze pokojowej. Przygotowaną i uprzednio nawilżoną glebę można przed wzbogaceniem przechowywać w chłodnym miejscu przez maksymalny okres trzech dni; należy dołożyć starań, by zminimalizować odparowanie wody. Glebę wzbogaconą jednostką badaną należy zastosować niezwłocznie, chyba że istnieją informacje wskazujące, że daną glebę można przechowywać bez wpływu dla toksyczności i biodostępności jednostki badanej. Próbki wzbogaconej gleby można następnie, do czasu ich analizy, przechowywać w warunkach zalecanych dla danej jednostki badanej.

▼M4

Dodatek 5

Gatunki skąposzczetów lądowych zalecane do wykorzystania w badaniu bioakumulacji z gleby

Dżdżownice

Zaleca się wykorzystanie w badaniu gatunku *Eisenia fetida* (Savigny 1826), należącego do rodziny dżdżownicowatych. Od 1972 r. rozróżnia się dwa podgatunki tego gatunku (*Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* (10)). Według Jaenike (36) są to dwa prawdziwie osobne gatunki. *Eisenia fetida* można łatwo rozpoznać dzięki jej jasnym żółtym paskom między segmentami, zaś *Eisenia andrei* charakteryzuje się jednolitą ciemnoczerwoną barwą. Gatunki te pochodzą prawdopodobnie z regionu Morza Czarnego, a obecnie występują na całym świecie, zwłaszcza w siedliskach modyfikowanych przez działalność człowieka, na przykład w pryzmach kompostowych. Organizmy obydwu tych gatunków można wykorzystywać do badań ekotoksykologicznych i badań bioakumulacji.

Eisenia fetida i *Eisenia andrei* są dostępne na rynku, np. jako przynęta na ryby. W porównaniu z innymi dżdżownicami z rodziny dżdżownicowatych organizmy te mają krótki cykl życia i osiągają dojrzałość w ciągu ok. 2–3 miesięcy (w temperaturze pokojowej). Optymalną dla nich temperaturą jest ok. 20–24 °C. Gatunki te preferują względnie wilgotne podłoża z prawie neutralnym pH oraz wysoką zawartością materiału organicznego. Jako że od około 25 lat powszechnie wykorzystuje się je w zestandaryzowanych badaniach ekotoksykologicznych, ich hodowla jest dobrze opisana (48) (77).

Obydwa gatunki można hodować w różnych odchodach zwierzęcych. Pożywką hodowlaną zalecaną przez ISO (35) jest mieszanina obornika końskiego lub krowiego oraz torfu w stosunku 50:50. Taka pożywka powinna mieć wartość pH na poziome około 6 do 7 (regulowane węglanem wapnia), niskie przewodnictwo jonowe (niższe niż 6 mS/cm lub niższe niż 0,5 % stężenia soli) oraz nie powinna być zbyt zanieczyszczona amoniakiem lub zwierzęcym moczem. Można także zastosować dostępną na rynku glebę ogrodniczą niezawierającą dodatków lub też glebę sztuczną zgodnie z OECD (48), lub też mieszaninę takich dwóch gleb w proporcji 50:50. Podłoże powinno być wilgotne, ale nie zbytnio mokre. Do hodowli odpowiednie są skrzynki hodowlane o pojemności od 10 do 50 litrów.

Aby uzyskać organizmy o standardowym wieku i masie, hodowlę najlepiej rozpocząć z zastosowaniem kokonów. W tym celu dorosłe organizmy dodaje się do skrzynki hodowlanej zawierającej świeże podłoże w celu wytworzenia kokonów. Doświadczenie pokazuje, że dobre wskaźniki rozmnażania uzyskuje się przy zagęszczeniu na poziomie około 100 dorosłych organizmów na kg podłoża (masa mokra). Po 28 dniach usuwa się dorosłe organizmy. Dżdżownice wyklute z kokonów wykorzystuje się do badania w chwili, gdy osiągną one dojrzałość po co najmniej 2 miesiącach, lecz nie dłużej niż po 12 miesiącach.

Organizmy z gatunków opisanych powyżej można uznać za zdrowe, jeśli przekopują się przez podłoże, nie próbują opuścić podłoża oraz rozmnażają się w sposób ciągły. Bardzo powolne poruszanie się lub żółta tylna końcówka (w przypadku *Eisenia fetida*) wskazują na zużycie podłoża. W takim przypadku zaleca się zastosowanie świeżego podłoża lub mniejszej liczby zwierząt na jedną skrzynkę.

Dodatkowa wybrana bibliografia

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. Londyn, 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. Londyn 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, Londyn. 331–338 s.

Wazonkowcowate

Zaleca się wykorzystanie w badaniu gatunku *Enchytraeus albidus* Henle 1837. *Enchytraeus albidus* jest jednym z największych (do 15 mm) gatunków z rodziny wazonkowcowatych, typ: pierścienice, klasa: skąposzczety, oraz występuje na całym świecie (8). Organizmy tego gatunku można spotkać w siedliskach morskich, limnicznych i lądowych, głównie w rozkładającej się materii organicznej (wodorosty, kompost), oraz rzadziej także na łąkach (42). Ta duża tolerancja ekologiczna oraz niektóre odmiany morfologiczne wskazują, że w przypadku tego gatunku mogą istnieć różne rasy.

Enchytraeus albidus jest dostępny na rynku, sprzedawany jako pokarm dla ryb. Należy sprawdzić, czy kultura nie jest zanieczyszczona innymi, zazwyczaj mniejszymi, gatunkami (60). Jeśli takie zanieczyszczenie występuje, wszystkie organizmy badane należy umyć w wodzie na szalkach Petriego. Następnie w celu rozpoczęcia nowej kultury wybiera się duże dorosłe osobniki z gatunku *Enchytraeus albidus* (z pomocą mikroskopu stereoskopowego). Wszystkie inne organizmy odrzuca się. Cykl życia tego gatunku jest krótki i organizmy osiągają dojrzałość w okresie od 33 dni (przy temperaturze 18 °C) do 74 dni (przy temperaturze 12 °C). W badaniu należy wykorzystać wyłącznie kultury przechowywane w laboratorium przez okres co najmniej 5 tygodni bez żadnych problemów (jedno pokolenie).

Inne gatunki z rodzaju *Enchytraeus* również nadają się do wykorzystania w badaniu, zwłaszcza *Enchytraeus luxuriosus*. Organizmy tego gatunku są prawdziwymi mieszkańcami gleby, co zostało opisane w (65). W przypadku wykorzystania innych gatunków *Enchytraeus* należy je wyraźnie zidentyfikować oraz przedstawić uzasadnienie wyboru gatunku.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) jest gatunkiem należącym do tej samej grupy co *Enchytraeus luxuriosus*. Nie ma pewności, czy gatunek ten żyje na polach, jako że jego opisy dotyczą wyłącznie kultur dżdżownic i pryzm kompostowych (Römbke 2003). Tym samym nieznane są jego pierwotne wymagania ekologiczne. Niemniej jednak niedawne badania laboratoryjne z wykorzystaniem różnych gleb naturalnych potwierdziły, że gatunek ten ma dużą tolerancję na właściwości gleby, takie jak pH i tekstura (Jänsch i in. 2005). Ostatnio gatunek ten często wykorzystuje się w badaniach ekotoksykologicznych z uwagi na łatwość jego hodowli i badania, np. Kuperman i in. 2003). Jednak w porównaniu z *Enchytraeus albidus* jest to gatunek o małym rozmiarze (3–12 mm; średnio 7 mm (Westheide & Müller 1996)), co utrudnia jego stosowanie. Przy wykorzystaniu tego gatunku, zamiast *Enchytraeus albidus,* rozmiar naczynia do badania może być mniejszy, lecz nie musi. Ponadto należy wziąć pod uwagę, że ten gatunek rozmnaża się bardzo szybko i jego czas trwania pokolenia wynosi mniej niż 20 dni przy temperaturze 20 ± 2 °C (Achazi i in. 1999), a nawet krócej w wyższych temperaturach.

Organizmy z gatunku *Enchytraeus albidus* (a także inne gatunki z rodzaju *Enchytraeus*) można hodować w dużych plastikowych skrzyniach (np. o wymiarach 30 × 60 × 10 cm lub 20 × 12 × 8 cm, które są odpowiednie do hodowli organizmów małego rozmiaru) wypełnionych mieszaniną gleby sztucznej i dostępnej na rynku niezanieczyszczonej gleby ogrodowej niezawierającej dodatków. Należy unikać kompostu, ponieważ może on zawierać toksyczne substancje chemiczne, na przykład metale ciężkie. Przed wykorzystaniem gleby hodowlanej należy z niej usunąć faunę poprzez trzykrotne głębokie zamrażanie. Można także wykorzystać czystą glebę sztuczną, jednak szybkość rozmnażania może być wtedy mniejsza niż wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu podłoża mieszanego. Podłoże powinno mieć pH na poziomie 6,0 ± 0,5. Kulturę przechowuje się w inkubatorze w temperaturze 15 ± 2 °C, bez światła. We wszystkich przypadkach należy unikać temperatury wyższej niż 23 °C. Gleba sztuczna/naturalna powinna być wilgotna, lecz nie mokra. Gdy glebę delikatnie ściśnie się w dłoni, między palcami powinny pojawić się jedynie małe krople wody. We wszystkich przypadkach należy unikać warunków beztlenowych (np. jeśli stosuje się pokrywę, należy wykonać odpowiednią liczbę otworów w pokrywie w celu zapewnienia wystarczającej wymiany powietrza). Gleba hodowlana powinna być napowietrzana poprzez ostrożne wymieszanie jej raz w tygodniu.

▼M4

Organizmy należy karmić raz w tygodniu *ad libitum* płatkami owsianymi, które umieszcza się w zagłębieniu na powierzchni gleby i przykrywa glebą. Jeśli w pojemniku pozostało pożywienie z poprzedniego karmienia, ilość podawanego pożywienia należy odpowiednio dostosować. Jeśli na pozostałym pożywieniu wyrosły grzyby, należy je wymienić na nową porcję płatków owsianych. W celu stymulowania rozmnażania co dwa tygodnie do płatków owsianych można dodać dostępny na rynku proszek proteinowy z witaminami. Po trzech miesiącach zwierzęta przenosi się do świeżo przygotowanej kultury lub podłoża do hodowli. Płatki owsiane, które należy przechowywać w szczelnie zamykanych naczyniach, należy autoklawować lub podgrzać, aby uniknąć infekcji przenoszonych przez roztocza żerujące na pokarmach suchych (np. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) lub roztocza drapieżne (np. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). Po zdezynfekowaniu pożywienie się mieli, aby można je było łatwo rozmieścić na powierzchnię gleby. Innym możliwym źródłem pożywienia są drożdże piekarskie lub pokarm dla ryb TetraMin®.

Zasadniczo warunki hodowli są wystarczające, jeśli organizmy nie starają się opuścić podłoża, przekopują się szybko poprzez glebę, mają lśniącą zewnętrzną powłokę bez przyklejających się do niej cząstek gleby, mają mniej więcej białawą barwę oraz jeśli widoczne są organizmy w różnym wieku. Organizmy można uznać za zdrowe, jeśli rozmnażają się w sposób ciągły.

Dodatkowa wybrana bibliografia

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 i Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide W i Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267.

▼M6

C.31. BADANIE ROŚLIN LĄDOWYCH: BADANIE WSCHODÓW I WZROSTU SIEWEK

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 208 (2006). Okresowo dokonuje się przeglądu metod badawczych w świetle postępu naukowego i możliwości zastosowania do użytku regulacyjnego. Niniejsza zaktualizowana metoda badawcza ma służyć ocenie potencjalnego wpływu substancji chemicznych na wschody i wzrost siewek. W związku z tym nie obejmuje ona wpływu długoterminowego ani wpływu na rozrodczość (tj. zawiązywanie nasion, tworzenie kwiatów, dojrzewanie owoców). Należy uwzględnić warunki narażenia i właściwości badanej substancji chemicznej, aby upewnić się, że stosowane są odpowiednie metody badawcze (np. w przypadku badania metali/związków metali należy uwzględnić wpływ pH i powiązanych przeciwjonów) (1). Niniejsza metoda badawcza nie dotyczy roślin narażonych na działanie oparów substancji chemicznych. Przedmiotowa metoda badawcza ma zastosowanie do badania substancji chemicznych ogólnego zastosowania, produktów biobójczych i środków ochrony roślin (znanych również jako pestycydy). Metodę opracowano na podstawie istniejących metod (2) (3) (4) (5) (6) (7). Uwzględniono również inne odniesienia istotne dla badania roślin (8) (9) (10). Zastosowane definicje są podane w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

2. W badaniu ocenia się wpływ na wschody siewek i wczesny wzrost wyższych roślin po narażeniu na badaną substancję chemiczną w glebie (albo innej odpowiedniej matrycy gleby). Nasiona umieszcza się w kontakcie z glebą, do której wprowadzono badaną substancję chemiczną, i ocenia pod kątem skutków zwykle po upływie 14–21 dni, gdy wzejdzie 50 % siewek w grupie kontrolnej. Pomiar punktów końcowych polega na wizualnej ocenie wschodów siewek, suchej masy kiełków (ewentualnie mokrej masy kiełków) oraz, w niektórych przypadkach, wysokości kiełków, jak również na ocenie widocznego szkodliwego wpływu na różne części rośliny. Uzyskane pomiary i obserwacje porównuje się z pomiarami i obserwacjami dotyczącymi roślin z grupy kontrolnej niepoddanej zabiegowi.

3. W zależności od oczekiwanej drogi narażenia badaną substancję chemiczną łączy się z glebą (lub ewentualnie ze sztuczną matrycą gleby) albo umieszcza na jej powierzchni, co prawidłowo odzwierciedla potencjalną drogę narażenia na substancję chemiczną. Łączenie z glebą polega na wprowadzaniu do gleby luzem. Po wprowadzeniu glebę przenosi się do doniczek, a następnie wysiewa się do niej nasiona danego gatunku rośliny. Podanie powierzchniowe odbywa się na glebę umieszczoną w doniczkach, do której wysiano już nasiona. Zestawy badawcze (próby kontrolne i glebę poddaną zabiegowi wraz z nasionami) umieszcza się następnie w odpowiednich warunkach sprzyjających kiełkowaniu/wzrostowi roślin.

4. Badanie można przeprowadzić w celu wyznaczenia krzywej dawka-odpowiedź albo przy jednym stężeniu/poziomie jako badanie graniczne, w zależności od celu badania. Jeżeli wyniki badania przeprowadzonego przy jednym stężeniu/poziomie przekraczają określony poziom toksyczności (np. jeśli obserwowany jest wpływ większy niż x %), przeprowadza się badanie ustalające zakres, aby określić górne i dolne limity toksyczności, a następnie badanie przy wielu stężeniach/poziomach w celu uzyskania krzywej dawka-odpowiedź. Stosuje się odpowiednią analizę statystyczną w celu uzyskania stężenia efektywnego x % lub wskaźnika efektywnego stosowania Er_x (np. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) w odniesieniu do najbardziej wrażliwego parametru lub parametrów będących przedmiotem zainteresowania. Ponadto w niniejszym badaniu można obliczyć najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), oraz najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

5. Poniższe informacje są przydatne do ustalenia oczekiwanej drogi narażenia na substancję chemiczną oraz przy opracowywaniu badania: wzór strukturalny, czystość, rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w rozpuszczalnikach

▼M6

organicznych, współczynnik podziału 1-oktanol/woda, sorpcyjne właściwości gleby, prężność pary, trwałość w wodzie i pod działaniem światła oraz biodegradowalność.

WAŻNOŚĆ BADANIA

6. Aby badanie było ważne, muszą być spełnione następujące kryteria wykonania w próbach kontrolnych:

— wschody siewek muszą wynieść co najmniej 70 %;

— siewki nie przejawiają widocznych oznak fitotoksyczności (np. chlorozy, martwicy, więdnięcia, deformacji liści i łodygi), a rośliny przejawiają wyłącznie wahania w zakresie wzrostu i morfologii typowe dla danego gatunku;

— średnia przeżywalność wszeszłych siewek z próby kontrolnej wynosi co najmniej 90 % w okresie badania;

— warunki otoczenia dla danego gatunku są identyczne i pożywka zawiera taką samą ilość matrycy gleby, pożywki pomocniczej lub podłoża z tego samego źródła.

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

7. Substancję chemiczną odniesienia można badać w regularnych odstępach czasu, aby upewnić się, że wynik badania i reakcja danych badanych roślin oraz warunki badania nie uległy znacznej zmianie w czasie. Ewentualnie można wykorzystać historyczne pomiary biomasy lub wzrostu w próbach kontrolnych w celu dokonania oceny wyników układu badawczego w określonych laboratoriach; mogą one posłużyć jako międzylaboratoryjny pomiar jakości prób kontrolnych.

OPIS METODY

Gleba naturalna – podłoże sztuczne

8. Rośliny można uprawiać w doniczkach wypełnionych gliną piaszczystą, piaskiem gliniastym lub gliną piaszczysto-ilastą o zawartości węgla organicznego do 1,5 % (około 3 % materii organicznej). Można również zastosować dostępną na rynku ziemię doniczkową lub syntetyczną mieszankę glebową o zawartości węgla organicznego do 1,5 %. Nie należy stosować gleb gliniastych, jeżeli wiadomo, że badana substancja chemiczna ma wysokie powinowactwo do glin. Glebę z pola należy przesiać do cząstek o wielkości 2 mm, tak aby ją ujednorodnić i usunąć cząstki gruboziarniste. Należy odnotować rodzaj i teksturę gleby, zawartość procentową węgla organicznego, pH i zawartość soli, jak również przewodnictwo elektronowe ostatecznie przygotowanej gleby. Glebę należy sklasyfikować zgodnie ze standardowym schematem klasyfikacji (11). Glebę można poddać pasteryzacji lub obróbce cieplnej w celu zmniejszenia wpływu patogenów występujących w glebie.

9. Naturalna gleba może utrudnić interpretację wyników i zwiększyć ich zmienność ze względu na zróżnicowane właściwości fizyczne/chemiczne i populacje mikrobiologiczne. Z kolei te zmienne modyfikują zdolność zatrzymywania wilgoci, efekt wiązania chemicznego, napowietrzenie oraz zawartość składników odżywczych i pierwiastków śladowych. Poza różnicami w zakresie wspomnianych czynników fizycznych będą również występowały różnice we właściwościach chemicznych, takich jak pH i potencjał redoks, co może wpłynąć na biodostępność badanej substancji chemicznej (12) (13) (14).

10. Podłoża sztuczne zazwyczaj nie są stosowane do badania środków ochrony roślin, ale można je wykorzystywać do badania substancji chemicznych ogólnego zastosowania albo w przypadku gdy wskazane jest zmniejszenie zmienności powodowanej przez naturalne gleby i zwiększenie porównywalności wyników badania. Zastosowane podłoża powinny składać się z obojętnych materiałów, które minimalizują oddziaływanie z badaną substancją chemiczną, nośnikiem rozpuszczalnikowym lub obydwoma tymi elementami.

▼M6

Ustalono, że odpowiednimi obojętnymi materiałami, które w minimalnym stopniu absorbują badaną substancję chemiczną (15), zapewniając maksymalną dostępność substancji chemicznej dla siewki poprzez pobieranie przez korzenie, są piasek kwarcowy przemyty kwasem, wełna mineralna oraz kulki szklane (np. o średnicy 0,35–0,85 mm). Nieodpowiednimi podłożami będą między innymi wermikulit, perlit albo inne wysoce absorpcyjne materiały. Należy zapewnić składniki odżywcze wspomagające wzrost rośliny, aby zagwarantować, że rośliny nie znajdują się w warunkach stresowych ze względu na niedobór składników odżywczych, i w razie potrzeby należy to ocenić za pomocą analizy chemicznej lub wizualnej oceny roślin z próby kontrolnej.

Kryteria doboru badanych gatunków

11. Zakres wybranych gatunków powinien być w miarę możliwości szeroki, np. uwzględniający ich zróżnicowanie taksonomiczne w królestwie roślin, rozmieszczenie, liczebność, charakterystykę cyklu życiowego danego gatunku oraz region występowania w naturze, tak aby uzyskać pewien zakres odpowiedzi (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Przy doborze badanych gatunków należy wziąć pod uwagę następujące cechy możliwych gatunków:

— gatunki mają jednolite nasiona, które można łatwo uzyskać ze standardowych źródłach nasion i które zapewniają powtarzalne, niezawodne i równe kiełkowanie, jak również jednolity wzrost siewek;

— roślina jest odpowiednia do badań w laboratorium i może dawać wiarygodne i powtarzalne wyniki na tych samych i różnych urządzeniach badawczych;

— wrażliwość gatunku wykorzystywanego do badań powinna być spójna z reakcjami roślin znalezionych w otoczeniu i wystawionych na działanie substancji chemicznej;

— zostały one wykorzystane w pewnym stopniu we wcześniejszych badaniach toksyczności i ich wykorzystanie na przykład w pomiarach aktywności biologicznej herbicydów, badaniu przesiewowym na obecność metali ciężkich, badaniach zasolenia lub niedoboru składników mineralnych lub badaniach allelopatii wskazuje na wrażliwość na szereg różnorodnych stresorów;

— są zgodne z warunkami wzrostu określonymi w metodzie badawczej;

— spełniają kryteria ważności badania.

Niektóre z badanych gatunków, które historycznie najczęściej wykorzystywano do badań, są wymienione w dodatku 2, zaś potencjalne gatunki nieużywane do upraw znajdują się w dodatku 3.

12. Liczba gatunków, które zostaną objęte badaniem, zależy od odpowiednich wymogów regulacyjnych, w związku z czym nie jest określona w niniejszej metodzie badawczej.

Zastosowanie badanej substancji chemicznej

13. Substancję chemiczną należy wprowadzić w odpowiednim nośniku (np. wodzie, acetonie, etanolu, glikolu polietylenowym, gumie arabskiej, piasku). Badanie może również obejmować mieszaniny (produkty gotowe do stosowania lub preparaty) zawierające substancje czynne i różne adiuwanty.

Wprowadzenie do gleby / podłoża sztucznego

14. Substancje chemiczne, które są rozpuszczalne w wodzie lub zawieszone w wodzie, można dodać do wody, a następnie otrzymany roztwór miesza się z glebą w odpowiednim urządzeniu mieszającym. Tego rodzaju badanie może być odpowiednie, jeżeli narażenie na substancję chemiczną następuje za pośrednictwem gleby lub glebowej wody porowej oraz jeżeli istnieją obawy dotyczące pobierania przez korzenie. Dodanie badanej substancji chemicznej nie powinno powodować przekroczenia pojemności wodnej gleby. Objętość dodanej wody powinna być taka sama dla każdego badanego stężenia, ale powinna być ograniczona, aby zapobiec zbrylaniu się gleby.

▼M6

15. Substancje chemiczne o niższej rozpuszczalności w wodzie należy rozpuścić w odpowiednim lotnym rozpuszczalniku (np. acetonie, etanolu) i wymieszać z piaskiem. Następnie rozpuszczalnik można usunąć z piasku, kierując strumień powietrza i jednocześnie stale mieszając piasek. Tak przygotowany piasek miesza się z glebą doświadczalną. Do drugiej próby kontrolnej dodaje się tylko piasek i rozpuszczalnik. Do wszystkich poziomów zabiegu i drugiej próby kontrolnej dodaje się równe ilości piasku z wmieszanym i usuniętym rozpuszczalnikiem. W przypadku nierozpuszczalnych badanych substancji chemicznych będących ciałami stałymi suchą glebę i substancję chemiczną miesza się w odpowiednim urządzeniu mieszającym. Następnie glebę przekłada się do doniczek i natychmiast wysiewa się nasiona.

16. Jeżeli zamiast gleby stosuje się podłoże sztuczne, substancje chemiczne, które są rozpuszczalne w wodzie, można rozpuścić w substancji biogennej tuż przed rozpoczęciem badania. Substancje chemiczne, które nie są rozpuszczalne w wodzie, ale które można zawiesić w wodzie za pomocą nośnika rozpuszczalnikowego, należy dodać wraz z nośnikiem do substancji biogennej. Nierozpuszczalne w wodzie substancje chemiczne, dla których nie jest dostępny nietoksyczny, rozpuszczalny w wodzie nośnik, należy rozpuścić w odpowiednim lotnym rozpuszczalniku. Otrzymany roztwór miesza się z piaskiem lub kulkami szklanymi, umieszcza w próżniowej wyparce rotacyjnej i odparowuje, pozostawiając jednolitą warstwę substancji chemicznej na piasku lub kulkach. Przed wypełnieniem doniczek zważoną porcję kulek należy poddać ekstrakcji w tym samym rozpuszczalniku organicznym i oznaczyć substancję chemiczną.

Zastosowanie powierzchniowe

17. W przypadku środków ochrony roślin badaną substancję chemiczną często aplikuje się poprzez zroszenie powierzchni gleby roztworem do badań. Cały sprzęt wykorzystany do przeprowadzenia badań, w tym sprzęt wykorzystany do przygotowania i podania badanej substancji chemicznej, powinien charakteryzować się taką konstrukcją i pojemnością, aby można było przeprowadzić badania z udziałem tego sprzętu w sposób precyzyjny oraz aby otrzymane pokrycie było odtwarzalne. Pokrycie powinno być jednolite na wszystkich powierzchniach gleby. Należy dołożyć starań, aby uniknąć możliwej adsorbcji substancji chemicznych przez sprzęt lub zajścia reakcji między substancjami a sprzętem (np. rury z tworzywa sztucznego i lipofilowe substancje chemiczne czy części stalowe i pierwiastki). Badaną substancję chemiczną rozpryskuje się na powierzchnię gleby, symulując typową aplikację za pomocą opryskiwacza. Zasadniczo objętości użyte do opryskiwania powinny być zgodne z normalną praktyką rolniczą i zwykle stosowanymi objętościami (należy uwzględnić w sprawozdaniu ilość wody itp.). Należy dobrać rodzaj dyszy, aby zapewnić jednolite pokrycie powierzchni gleby. W przypadku gdy stosowane są rozpuszczalniki i nośniki, należy utworzyć drugą grupę kontrolną roślin otrzymującą wyłącznie rozpuszczalnik/nośnik. Jest to konieczne w przypadku środków ochrony roślin badanych w formie preparatów.

Weryfikacja stężenia/poziomu badanej substancji chemicznej

18. Stosowane stężenia/poziomy muszą zostać potwierdzone odpowiednią weryfikacją analityczną. W przypadku rozpuszczalnych substancji chemicznych weryfikację wszystkich badanych stężeń/poziomów można potwierdzić za pomocą analizy najwyższego stężenia roztworu użytego do badań wraz z dokumentacją na temat późniejszego rozcieńczenia i wykorzystania skalibrowanego sprzętu do podawania substancji (np. skalibrowanych naczyń szklanych do analizy, kalibracji urządzeń do opryskiwania). W przypadku nierozpuszczalnych substancji chemicznych weryfikacja związku musi obejmować wagi badanej substancji chemicznej dodanej do gleby. Jeżeli wymagane jest wykazanie jednorodności, konieczna może być analiza gleby.

PROCEDURA

Projekt badania

19. Do doniczek wysiewa się nasiona tego samego gatunku. Liczba wysianych nasion na doniczkę będzie zależała od gatunku, wielkości doniczki i czasu trwania badania.Liczba roślin na doniczkę powinna zapewniać odpowiednie warunki wzrostu oraz uniemożliwiać nadmierne zagęszczenie roślin w doniczce przez cały czas trwania badania. Maksymalna gęstość wysiewu wynosi około 3–10 nasion na 100 cm^2 w zależności od wielkości nasion. Przykładowo zaleca się od jednego do dwóch nasion kukurydzy, soi, pomidora, ogórka lub buraka cukrowego na pojemnik o długości 15 cm; trzy

▼M6

nasiona rzepaku lub grochu na pojemnik o długości 15 cm; oraz 5–10 nasion cebuli, pszenicy albo innych małych nasion na pojemnik o długości 15 cm. Liczba nasion i doniczek z kontrpróbą (kontrpróbę definiuje się jako doniczkę, dlatego też rośliny w tej samej doniczce nie stanowią kontrpróby) powinna być odpowiednia dla optymalnej analizy statystycznej (21). Należy zauważyć, że zmienność będzie większa dla tych badanych gatunków, w przypadku których wysiewa się mniejszą liczbę dużych nasion na doniczkę (kontrpróba), niż dla tych, w przypadku których możliwe jest użycie większej liczby małych nasion na doniczkę. Zmienność tę można zminimalizować, wysiewając jednakową liczbę nasion do każdej doniczki.

20. Stosuje się grupy kontrolne w celu upewnienia się, że obserwowany wpływ jest związany wyłącznie z narażeniem na badaną substancję chemiczną lub można go przypisać wyłącznie takiemu narażeniu. Odpowiednia grupa kontrolna powinna być identyczna pod każdym względem z grupą badaną z wyjątkiem narażenia na badaną substancję chemiczną. W ramach danego badania wszystkie rośliny wykorzystane do badań łącznie z próbą kontrolną powinny pochodzić z tego samego źródła. Aby zapobiec błędowi systematycznemu, wymagane jest losowe przydzielanie doniczek do grupy badanej i kontrolnej.

21. Należy unikać stosowania nasion zaprawionych insektycydem lub fungicydem. Niektóre organy regulacyjne dopuszczają jednak stosowanie określonych fungicydów o działaniu powierzchniowym, tzw. fungicydów kontaktowych (takich jak kaptan, tiuram) (22). Jeżeli istnieje obawa dotycząca patogenów przenoszonych przez nasiona, można na krótko zanurzyć nasiona w słabym 5-procentowym roztworze podchlorynu, a następnie opłukać je obficie pod bieżącą wodą i osuszyć. Zapobiegawcze podawanie innych środków ochrony roślin jest niedozwolone.

Warunki badania

22. Warunki badania powinny być zbliżone do warunków koniecznych dla normalnego wzrostu badanych gatunków i odmian (przykładowe warunki badania zawiera dodatek 4). Wschodzące rośliny należy utrzymywać zgodnie z dobrą praktyką ogrodniczą w komorach, fitotronach lub szklarniach o kontrolowanym środowisku. W przypadku korzystania z systemów wspomagających wzrost takie praktyki zwykle obejmują kontrolowanie i odpowiednio częste (np. codzienne) rejestrowanie temperatury, wilgotności, stężenia dwutlenku węgla, światła (natężenia, długości fali, promieniowania fotosyntetycznie czynnego) oraz okresu oświetlenia, sposobów nawadniania itp., aby zagwarantować prawidłowy wzrost roślin ustalony na podstawie porównania z roślinami wybranego gatunku z próby kontrolnej. Temperaturę w szklarni należy kontrolować za pomocą systemów wentylacji, ogrzewania lub chłodzenia. Następujące warunki są zasadniczo zalecane w przypadku badań prowadzonych w szklarniach:

— temperatura: 22 °C ± 10 °C;

— wilgotność: 70 % ± 25 %;

— fotoperiod: co najmniej 16 godzin światła;

— natężenie światła: 350 ± 50 mE/m2/s; dodatkowe oświetlenie może być konieczne, jeżeli natężenie spada poniżej 200 mE/m2/s, długość fali 400–700 nm, z wyjątkiem niektórych gatunków, które mają mniejsze wymagania w zakresie światła.

Warunki otoczenia należy monitorować i odnotowywać w sprawozdaniach przez cały czas trwania badania. Rośliny należy uprawiać w nieporowatych doniczkach z tworzywa sztucznego lub doniczkach szkliwionych z podstawką lub spodkiem pod doniczką. Okresowo można zmieniać ustawienie doniczek, aby zminimalizować różnice we wzroście roślin (ze względu na różnice

▼M6

w warunkach badania w obrębie systemów wspomagających wzrost). Doniczki muszą być wystarczająco duże, aby umożliwiać normalny wzrost.

23. W razie potrzeby można uzupełniać składniki odżywcze w glebie w celu utrzymania odpowiedniego wigoru. Zapotrzebowanie na dodatkowe składniki odżywcze i częstotliwość ich podawania można ocenić na podstawie obserwacji roślin z grupy kontrolnej. Zaleca się nawadnianie pojemników badawczych od strony dna (np. za pomocą sznurów z włókna szklanego). Początkowo można jednak stosować nawadnianie od góry w celu stymulowania kiełkowania nasion; w przypadku aplikacji na powierzchnię gleby taki sposób nawadniania ułatwia wniknięcie substancji chemicznej do gleby.

24. Konkretne warunki wzrostu powinny być odpowiednie dla badanego gatunku i badanej substancji chemicznej. Rośliny w grupie kontrolnej i grupie badanej muszą być utrzymywane w identycznych warunkach otoczenia, należy jednak podjąć stosowne działania, aby zapobiec narażeniu krzyżowemu (np. na lotne substancje chemiczne) pomiędzy różnymi zabiegami oraz narażeniu grup kontrolnych na badaną substancję chemiczną.

Badanie przy jednym stężeniu/poziomie

25. Aby ustalić odpowiednie stężenie/poziom substancji chemicznej do celów przeprowadzenia badania przy jednym stężeniu lub poziomie (prowokacyjnym/granicznym), należy uwzględnić szereg czynników. W przypadku substancji chemicznych ogólnego zastosowania obejmują one właściwości fizyczne/chemiczne substancji chemicznej. W przypadku środków ochrony roślin należy wziąć pod uwagę właściwości fizyczne/chemiczne i schemat stosowania badanej substancji chemicznej, jej maksymalne stężenie lub poziom stosowania, liczbę zastosowań na sezon lub trwałość badanej substancji chemicznej. Aby ustalić, czy substancja chemiczna ogólnego zastosowania posiada właściwości fitotoksyczne, wskazane może być wykonanie badania przy maksymalnym poziomie 1 000 mg/kg suchej gleby.

Badanie ustalające zakres stężeń

26. W razie potrzeby można wykonać badanie ustalające zakres, aby zapewnić wytyczne dotyczące stężeń/poziomów, które należy zbadać w ostatecznym badaniu dawka-odpowiedź. Na potrzeby badania ustalającego zakres badane stężenia/poziomy powinny znacznie różnić się od siebie (np. 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg suchej gleby). W przypadku środków ochrony roślin stężenia/poziomy powinny opierać się na zalecanych lub maksymalnych stężeniach lub poziomach stosowania, np. 1/100, 1/10, 1/1 zalecanego lub maksymalnego stężenia lub poziomu stosowania.

Badania przy wielu stężeniach/poziomach

27. Celem badania przy wielu stężeniach/poziomach jest określenie zależności dawka-odpowiedź oraz ustalenie wartości EC_x lub ER_x w odniesieniu do wschodów, biomasy lub zmian wizualnych w porównaniu z próbami kontrolnymi nienarażonymi na działanie substancji, zgodnie z wymaganiami organów regulacyjnych.

28. Liczba i zróżnicowanie stężeń lub poziomów powinny być wystarczające do uzyskania wiarygodnej zależności dawka-odpowiedź i równania regresji oraz otrzymania oszacowania EC_x. lub ER_x. Wybrane stężenia/poziomy powinny obejmować wartości EC_x lub ER_x, które mają zostać ustalone. Na przykład jeżeli wymagana jest wartość EC_{50}, wskazane byłoby wykonanie badania przy poziomach, które dają skutek rzędu 20–80 %. Aby to uzyskać, zalecana liczba badanych stężeń/poziomów wynosi co najmniej pięć stężeń/poziomów

▼M6

uporządkowanych w szereg geometryczny plus jedna grupa kontrolna nieobjęta działaniem substancji, przy czym każde kolejne stężenie nie powinno być większe niż trzykrotność poprzedniego. Dla każdej grupy badanej i kontrolnej liczba kontrprób powinna wynosić co najmniej cztery, a całkowita liczba nasion powinna wynosić co najmniej 20. W celu zwiększenia mocy statystycznej badania potrzebna może być większa liczba kontrprób roślin o wolniejszym tempie kiełkowania lub zmiennych schematach wzrostu. W przypadku zastosowania większej liczby badanych stężeń/poziomów można zmniejszyć liczbę kontrprób. Jeżeli wymagane jest oszacowanie NOEC, konieczne może być zastosowanie większej liczby kontrprób w celu uzyskania pożądanej mocy statystycznej (23).

Obserwacje

29. W okresie obserwacji, tj. po upływie 14–21 dni po wzejściu 50 % roślin z grupy kontrolnej (również z grup kontrolnych z rozpuszczalnikiem, jeżeli są dostępne), rośliny są często obserwowane (co najmniej raz w tygodniu, a w miarę możliwości codziennie) pod kątem wschodów i widocznych oznak fitotoksyczności i śmiertelności. Po zakończeniu badania należy odnotować pomiar procentowych wschodów i biomasy ocalałych roślin, jak również widoczny negatywny wpływ na różne części rośliny. Wspomniane negatywne skutki obejmują anomalie w wyglądzie siewek, zahamowany wzrost, chlorozę, zmianę barwy, śmiertelność i wpływ na rozwój roślin. Biomasę końcową można zmierzyć z wykorzystaniem końcowej średniej suchej masy kiełków ocalałych roślin, ścinając kiełki przy powierzchni gleby i susząc je do otrzymania stałej masy w temperaturze 60 °C. Ewentualnie biomasę końcowa można zmierzyć z wykorzystaniem mokrej masy kiełków. Kolejnym parametrem docelowym może być wysokość kiełków, jeżeli jest to wymagane przez organy regulacyjne. Do oceny obserwowalnych efektów toksycznych należy zastosować jednolity system oceny punktowej widocznych uszkodzeń. Przykłady przeprowadzania jakościowej i ilościowej oceny wizualnej i przyznawania punktów można znaleźć w pozycjach (23) (24).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Analiza statystyczna

Badanie przy jednym stężeniu/poziomie

30. Analizę danych dotyczących każdego gatunku roślin należy przeprowadzić z wykorzystaniem odpowiedniej metody statystycznej (21). Należy odnotować w sprawozdaniu poziom skutku przy badanym stężeniu/poziomie albo brak określonego skutku przy badanym stężeniu/poziomie (np. przy stężeniu lub poziomie *y* zaobserwowano *x %* skutku).

Badanie przy wielu stężeniach/poziomach

31. Zależność dawka-odpowiedź określa się na podstawie równania regresji. Zastosować można różne modele, na przykład w celu oszacowania wartości EC_x lub ER_x (np. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) i ich granic ufności w postaci danych binarnych w odniesieniu do wschodów odpowiednie mogą być np. metody analizy logitowej, probitowej, analizy Weibulla, metoda Spearmana-Kärbera czy uproszczona metoda Spearmana-Kärbera. W odniesieniu do wzrostu siewek (wagi i wysokości) jako ciągłych punktów końcowych, EC_x lub ER_x i ich granice ufności można oszacować, stosując odpowiednią analizę regresji (np. analizę regresji nieliniowej Bruce'a-Versteega (25)). W miarę możliwości R^2 powinno wynosić co najmniej 0,7 w przypadku najwrażliwszych gatunków, a zastosowane badane stężania/poziomy powinny obejmować 20–80 % skutków. Jeżeli konieczne jest oszacowanie NOEC, zaleca się zastosowanie testów statystycznych o dużej mocy, które należy wybrać na podstawie rozkładu danych (21) (26).

Sprawozdanie z badania

32. Sprawozdanie z badania powinno zawierać wyniki badań, jak również szczegółowy opis warunków badania, dokładne omówienie wyników, analizę danych oraz wnioski wyciągnięte z analizy. Należy przedstawić tabelaryczne zestawienie oraz streszczenie wyników. Sprawozdanie musi zawierać następujące informacje.

▼**M6**

Badana substancja chemiczna:

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, istotne właściwości badanej substancji chemicznej (np. logarytm P_{ow}, rozpuszczalność w wodzie, prężność pary oraz informacje o losach środowiskowych i zachowaniu w środowisku, jeżeli są dostępne);

— szczegółowe dane dotyczące sporządzenia roztworu do badań oraz weryfikacji badanych stężeń, jak określono w pkt 18.

Badany gatunek:

— szczegółowe informacje dotyczące organizmu użytego do badania: gatunek/odmiana, rodzina roślin, nazwa systematyczna i zwyczajowa, źródło oraz jak najbardziej szczegółowa historia nasion (np. nazwa dostawcy, zdolność kiełkowania, klasa wielkości nasion, numer partii lub serii, rok pochodzenia nasion lub sezonu wegetacyjnego podczas którego je zebrano, data oceny kiełkowania), żywotność itd.;

— liczba badanych gatunków jedno- i dwuliściennych;

— uzasadnienie wyboru gatunków;

— opis przechowywania, zaprawiania i konserwacji nasion.

Warunki badania:

— aparatura badawcza (np. komora wzrostu, fitotron i szklarnia);

— opis układu badawczego (np. wymiary doniczek, materiał, z którego wykonano doniczki, i ilości gleby);

— charakterystyka gleby (tekstura lub rodzaj gleby: rozmieszczenie cząstek gleby i klasyfikacja, właściwości fizykochemiczne w tym % materii organicznej, % węgla organicznego i pH);

— przygotowanie gleby/podłoża przed badaniem (np. gleba, sztuczna gleba, piasek i inne);

— opis pożywki, jeżeli została zastosowana;

— zastosowanie badanej substancji chemicznej: opis metody zastosowania, opis sprzętu, poziomy narażenia i objętości, w tym weryfikacja chemiczna, opis metody kalibracji oraz opis warunków otoczenia panujących podczas zastosowania;

— natężenie światła (np. PAR, promieniowanie fotosyntetycznie czynne), fotoperiod, maksymalne/minimalne temperatury, harmonogram i sposób nawadniania, nawożenie;

— liczba nasion na doniczkę, liczba roślin na dawkę, liczba kontrprób (doniczek) na poziom narażenia;

— rodzaj i liczba prób kontrolnych (ujemne lub dodatnie próby kontrolne, próba kontrolna z rozpuszczalnikiem, jeżeli została zastosowana);

— czas trwania badania.

Wyniki:

— zestawienie wszystkich punktów końcowych w przypadku każdej kontrpróby, badanego stężenia/poziomu i gatunku;

— liczba i procent wschodów w porównaniu z próbami kontrolnymi;

— pomiary biomasy (suchej lub mokrej masy kiełków) roślin jako odsetek prób kontrolnych;

▼M6

— wysokość kiełków roślin jako odsetek prób kontrolnych, jeżeli została zmierzona;

— procent widocznych uszkodzeń oraz jakościowy i ilościowy opis widocznych uszkodzeń (chloroza, martwica, więdnięcie, deformacja liści i łodygi, jak również ewentualny brak skutków) spowodowanych badaną substancją chemiczną w porównaniu z roślinami z próby kontrolnej;

— opis skali stosowanej do oceny widocznych uszkodzeń, jeżeli przeprowadzono ocenę wizualną;

— w przypadku badań obejmujących jeden poziom w sprawozdaniu należy odnotować odsetek uszkodzeń;

— wartości EC_x lub ER_x (np. EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) i powiązane granice ufności. Jeżeli zastosowana została analiza regresji, należy przedstawić błąd standardowy w odniesieniu do równania regresji oraz błąd standardowy w przypadku poszczególnych oszacowań parametru (np. nachylenie, punkt przecięcia);

— wartości NOEC (oraz LOEC), jeżeli zostały obliczone;

— opis procedur statystycznych oraz wykorzystane założenia;

— graficzne przedstawienie tych danych oraz zależności dawka-odpowiedź w przypadku badanych gatunków.

Odchylenia od procedur opisanych w niniejszej metodzie badawczej oraz wszelkie nietypowe zdarzenia, jakie miały miejsce podczas badania.

BIBLIOGRAFIA

(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) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna. (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) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna. (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) Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, część 158.540. Poddział J, części 122-1 i 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. Seria raportów technicznych nr 145. Canadian Wildlife Service (siedziba główna), Environment Canada, Hull, Québec, Kanada.

▼**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. Nr 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, Centrum Toksykologii, Uniwersytet w Guelph, Ontario, Kanada.

(11) Soil Texture Classification (systemy US i FAO): Weed Science, 33, suplement 1 (1985) oraz Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) Audus L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. W: Audus, L.J. (red.) *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, Londyn, Nowy York, Academic Press, NY, rozdział 5, s. 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) Urząd ds. Żywności i Leków (FDA) Stanów Zjednoczonych. (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 s., FDA, Waszyngton D.C.

(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 tom 58: 1161–1174

(17) 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, tom 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, tom 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) 155–271. 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). Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Seria dotycząca badań i oceny, nr 54, Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż.

(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 G. Friesen. (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. W: B. Truelove (red.) Research Methods in Weed Science, wydanie 2. 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, 1 485–1 492.

(26) Rozdział C.33 niniejszego załącznika: Badanie rozrodczości dżdżownic (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).

▼M6

Dodatek 1

DEFINICJE

Substancja czynna (lub substancja aktywna) jest to materiał służący do wywołania określonego skutku biologicznego (np. zwalczania owadów, zwalczania chorób roślin, zwalczania chwastów na obszarze, na którym przeprowadza się zabieg), znany również jako czysty technicznie składnik aktywny.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Środki ochrony roślin lub pestycydy są to materiały posiadające określoną biologiczną aktywność, wykorzystywane specjalnie w celu ochrony roślin przed szkodnikami (np. grzybicami, owadami i konkurencyjnymi roślinami).

EC_x, stężenie efektywne x %, lub ER_x, dawka powodująca zmianę x % oznacza stężenie lub dawkę, których wynikiem jest niepożądana zmiana lub modyfikacja o x % w punkcie końcowym badania zmierzona w odniesieniu do próby kontrolnej (np. zmniejszenie o 25 % lub 50 % w zakresie wschodów siewek, wagi kiełków, ostatecznej liczby roślin lub zwiększenie liczby widocznych uszkodzeń stanowiłyby odpowiednio EC_{25}/ER_{25} lub EC_{50}/ER_{50}).

Wschód oznacza wykształcenie się koleoptylu lub liścienia nad powierzchnią gleby.

Preparat jest to dostępna w handlu użytkowa postać produktu zawierająca substancję czynną (składnik aktywny), znana również jako gotowy preparat [1] lub typowy produkt końcowego przeznaczenia.

LOEC (najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany) oznacza najniższe stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym zaobserwowano szkodliwe zmiany. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające LOEC ma statystycznie istotny skutek ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia przy porównaniu z próbą kontrolną i jest wyższe niż wartość NOEC.

Rośliny niebędące przedmiotem badania są to rośliny, które znajdują się poza docelowym obszarem porośniętym przez rośliny. W przypadku środków ochrony roślin dotyczy to zazwyczaj roślin znajdujących się poza obszarem, na którym przeprowadza się zabieg.

NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian) oznacza najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym nie zaobserwowano żadnych szkodliwych zmian. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające NOEC nie ma statystycznie istotnego skutku ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia, jeżeli porówna się je z próbą kontrolną.

Fitotoksyczność to negatywne odchylenia (oceniane na podstawie pomiarów i oceny wizualnej) od normalnego wzorca wyglądu i wzrostu roślin w reakcji na podanie danej substancji chemicznej.

Kontrpróba oznacza jednostkę doświadczalną, która odpowiada grupie kontrolnej lub grupie badanej. W niniejszych badaniach doniczka jest zdefiniowana jako kontrpróba.

Ocena wizualna oznacza oszacowanie widocznych uszkodzeń na podstawie obserwacji stanu roślin, wigoru, deformacji, chlorozy, martwicy i ogólnego wyglądu w porównaniu z próbą kontrolną.

Badana substancja chemiczna jest to dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

[1] Gotowy preparat: Gotowy preparat jest to użytkowa postać produktu zawierająca aktywną substancję chemiczną (składnik aktywny), dostępna w handlu.

▼**M6**

Dodatek 2

Lista gatunków stosowanych w przeszłości w badaniach roślin

Rodzina	Gatunek	Nazwy zwyczajowe
DWULIŚCIENNE		
Selerowate (Apiaceae, Umbelliferae)	*Daucus carota*	Marchew
Astrowate (Asteraceae, Compositae)	*Helianthus annuus*	Słonecznik
Astrowate (Asteraceae, Compositae)	*Lactuca sativa*	Sałata siewna
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	*Sinapis alba*	Gorczyca jasna
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Kapusta chińska
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	*Brassica napus*	Rzepak
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Kapusta
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	*Brassica rapa*	Rzepa
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Rzeżucha ogrodowa
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Rzodkiew zwyczajna
Komosowate (Chenopodiaceae)	*Beta vulgaris*	Burak cukrowy
Dyniowate (Cucurbitaceae)	*Cucumis sativus*	Ogórek
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Soja
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Fasola mung
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Fasola karłowa, fasola zwykła, fasola
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	*Pisum sativum*	Groch
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Kozieradka pospolita
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Komonica zwyczajna
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Koniczyna czerwona
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	*Vicia sativa*	Wyka
Lnowate (Linaceae)	*Linum usitatissimum*	Len
Rdestowate (Polygonaceae)	*Fagopyrum esculentum*	Gryka zwyczajna
Psiankowate (Solanaceae)	*Solanum lycopersicon*	Pomidor

▼**M6**

Rodzina	Gatunek	Nazwy zwyczajowe
JEDNOLIŚCIENNE		
Liliowate (Liliaceae, Amarylladaceae)	*Allium cepa*	Cebula
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	*Avena sativa*	Owies zwyczajny
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Jęczmień
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	*Lolium perenne*	Życica trwała
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	*Oryza sativa*	Ryż
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	*Secale cereale*	Żyto
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Ziarno sorgo, sorgo cukrowe
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	*Triticum aestivum*	Pszenica
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	*Zea mays*	Kukurydza zwyczajna

▼M6

Dodatek 3

Lista potencjalnych gatunków nieuprawnych

OECD Potencjalne gatunki, które wykorzystać można w badaniu toksyczności wobec roślin

Uwaga: Niniejsza tabela zawiera informacje dotyczące 52 gatunków nieuprawnych (w nawiasach podane zostały odniesienia dla każdej pozycji). Przedstawione poziomy wschodów zaczerpnięto z opublikowanej literatury i stanowią one jedynie ogólne wytyczne. Poszczególne doświadczenia mogą różnić się w zależności od źródła nasion i innych czynników.

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia [1] i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu [2]	Głębokość wysiewu (mm) [3]	Okres do wykiełkowania (dni) [4]	Specjalne zabiegi [5]	Badanie toksyczności [6]	Dostawcy nasion [7]	Inne odniesienia [8]
SELEROWATE (APIACEAE) *Torilis japónica* (kłobuczka pospolita)	A, B obszary naruszone, żywopłoty, pastwiska (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	Ś = C (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	stratyfikacja chłodna (7, 14, 18, 19) konieczne może być dojrzewanie (19) brak światła hamuje kiełkowanie (1, 19) brak specjalnych zabiegów (5)	PO (5)		
ASTROWATE (ASTERACEAE) *Bellis perennis* (stokrotka pospolita)	P obszary trawiaste, grunty orne, darń (16, 19)	0,09–0,17 (4, 19)	Ś = C (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (18, 19) brak specjalnych zabiegów (4, 14)	PO (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (chaber bławatek)	A pola, pobocza dróg, otwarte siedliska (16)	4,1–4,9 (4, 14)	Ś = C (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100 %) (14)	brak specjalnych zabiegów (2, 4)	PO (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (chaber ciemny)	P pola, pobocza dróg, otwarte siedliska (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	Ś = C (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	konieczne może być dojrzewanie (18, 19) brak światła hamuje kiełkowanie (19) brak specjalnych zabiegów (5, 14, 26)	PO (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (oman wielki)	P wilgotne, obszary naruszone (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		brak specjalnych zabiegów (4)	PO (4)	A, F	

▼M6

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ([1]) i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ([2])	Głębokość wysiewu (mm) ([3])	Okres do wykiełkowania (dni) ([4])	Specjalne zabiegi ([5])	Badanie toksyczności ([6])	Dostawcy nasion ([7])	Inne odniesienia ([8])
Leontodon hispidus (mlecz)	P pola, pobocza dróg, obszary naruszone (16, 19)	0,85–1,2 (14, 19)	Ś = C (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	brak światła hamuje kiełkowanie (17, 18, 19) brak specjalnych zabiegów (5, 23)	PO (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (rudbekia owłosiona)	B, P obszary naruszone (16)	0,3 (4), 14	Ś = C (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	brak specjalnych zabiegów (4, 14, 33)	PO (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (nawłoć kanadyjska)	P pastwiska, otwarte obszary (16)	0,06–0,08 (4, 14)	Ś = C (11)	0 (4)	14-21 (11)	wymieszać z równą częścią piasku i namaczać w 500 ppm kwasu giberelinowego przez 24 godz. (11) brak specjalnych zabiegów (4)	PO (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (rzepień)	A pola, otwarte siedliska (16)	25–61 (14, 29)		0(1) 5(29)		brak światła może hamować kiełkowanie (1) namaczać w ciepłej wodzie przez 12 godz. (29)	PRZED i PO (31)	A	
Xanthium spinosum (rzepień kolczasty)	A otwarte siedliska (16)	200 (14)	Ś = C (14) Ś > C (6)	10 (6)		wertykulacja (14) brak specjalnych zabiegów (6)	PRZED i PO (6)	A	
Xanthium strumarium (rzepień pospolity)	A pola, otwarte siedliska (16)	67,4 (14)	Ś = C (14)	10-20 (6, 21)		brak specjalnych zabiegów (6, 14, 21)	PRZED i PO (6, 21, 28, 31)	A	
KAPUSTOWATE (BRASSICACEAE) *Cardamine pratensis* (rzeżucha łąkowa)	P pola, pobocza dróg, darń (16, 19)	0,6 (14), 19	Ś = C (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	brak światła hamuje kiełkowanie (18, 19) brak specjalnych zabiegów (5, 14, 22)	PO (5, 22)	F	

▼M6

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia [1] i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu [2]	Głębokość wysiewu (mm) [3]	Okres do wykiełkowania (dni) [4]	Specjalne zabiegi [5]	Badanie toksyczności [6]	Dostawcy nasion [7]	Inne odniesienia [8]
GOŹDZIKOWATE (CARYOPHYLLACEAE) *Lychnis flos-cuculi* (firletka poszarpana)	P (16)	0,21 (14)	Ś = C (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	konieczne może być dojrzewanie (18) brak specjalnych zabiegów (5, 14, 15, 22–26)	PO (5, 15, 22–26)	F	
KOMOSOWATE (CHENOPODIACEAE) *Chenopodium album* (komosa biała)	A miedze, obszary naruszone (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	Ś = C (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	poddanie zabiegom różni się w zależności od koloru nasiona (19) suche przechowywanie w okresie spoczynku (19) brak światła hamuje kiełkowanie (1, 18, 19) stratyfikacja chłodna (18) brak specjalnych zabiegów (14, 34)	PRZED i PO (28, 31, 34)	A	32
KLUZJOWATE (CLUSIACEAE) *Hypericum perforatum* (dziurawiec zwyczajny)	P pola, grunty orne, otwarte siedliska (16, 19)	0,1–0,23 (14, 19)	Ś = C (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	brak światła hamuje kiełkowanie (1, 18, 19) brak specjalnych zabiegów (5, 14, 15, 25, 27)	PO (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
POWOJOWATE (CONVOLVULACEAE) *Ipomoea hederacea* (wilec bluszczowy)	A pobocza dróg, otwarte siedliska, pola uprawne (16)	28,2 (14)	Ś > C (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (6, 21)	PRZED i PO (6, 12, 21, 28)	A	
TURZYCOWATE (CYPERACEAE) *Cyperus rotundus* (turzyca)	P grunty orne, pastwiska, pobocza dróg (16, 30)	0,2 (14)	Ś = C (14)	0 (1) 10–20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	brak światła hamuje kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (6, 10, 14)	PRZED i PO (6, 28, 31)	B	7
BOBOWATE (FABACEAE) *Lotus corniculatus* (komonica zwyczajna)	P obszary trawiaste, pobocza dróg, otwarte siedliska (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	Ś = C (14)		1 (50 %) (19)	wertykulacja (14, 19) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (18, 19) brak specjalnych zabiegów (23, 25)	PO (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ([1]) i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ([2])	Głębokość wysiewu (mm) ([3])	Okres do wykiełkowania (dni) ([4])	Specjalne zabiegi ([5])	Badanie toksyczności ([6])	Dostawcy nasion ([7])	Inne odniesienia ([8])
Senna obtusifolia (strączyniec tępoliściowy)	A wilgotne lasy (16)	23-28 (9)	Ś = C (14) Ś > C (9)	10-20 (6,9)		namaczać nasiona w wodzie przez 24 godz. (9) wertykulacja (14) żywotność nasion różni się w zależności od koloru (1) brak specjalnych zabiegów (6)	PO (6,9)	A	
Sesbania exaltata (konopie)	A gleba aluwialna (16)	11–13 (9, 14)	Ś > C (9)	10–20 (9, 21)		namaczać nasiona w wodzie przez 24 godz. (9) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (21)	PRZED i PO (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (koniczyna czerwona)	P pola, pobocza dróg, grunty orne (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	Ś = C (14)		1 (50 %) (19)	wertykulacja (14, 18) konieczne może być dojrzewanie (19) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1, 19) brak specjalnych zabiegów (5)	PO (5)	A, E, F	
LAM IAC E AE *Leonurus cardiaca* (serdecznik pospolity)	P otwarte obszary (16)	0,75–1,0 (4, 14)	Ś = C (14)	0 (4)		brak specjalnych zabiegów (4, 14)	PO (4)	F	
Mentha spicata (mięta zielona)	P wilgotne obszary (16)	2,21 (4)		0 (4)		brak specjalnych zabiegów (4)	PO (4)	F	
Nepeta cataria (kocimiętka właściwa)	P obszary naruszone (16)	0,54 (4, 14)	Ś = C (14)	0 (4)		brak specjalnych zabiegów (2, 4, 14)	PO (2,4)	F	

▼M6

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ([1]) i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ([2])	Głębokość wysiewu (mm) ([3])	Okres do wykiełkowania (dni) ([4])	Specjalne zabiegi ([5])	Badanie toksyczności ([6])	Dostawcy nasion ([7])	Inne odniesienia ([8])
Prunella vulgaris (głowienka pospolita)	P grunty orne, obszary trawiaste, obszary naruszone (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	Ś = C (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	Ś = C brak światła hamuje kiełkowanie (18, 19) większe kiełkowanie w przypadku większych nasion (1) brak specjalnych zabiegów (4, 14, 22)	PO (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (bukwica zwyczajna)	P obszary trawiaste, miedze (19)	14–18 (14, 19)	Ś = C (14)		7 (50 %) (19)	brak specjalnych zabiegów (5, 14, 22)	PO (5, 22)	F	
ŚLAZOWATE (MALVACEAE) *Abutilón theophrasti* (zaślaz pospolity)	A pola, otwarte siedliska (16)	8,8 (14)	Ś = C (14)	10–20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	wertykulacja (14) brak specjalnych zabiegów (5, 10, 21)	PRZED i PO (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (ślazowiec ciernisty)	A pola, pobocza dróg (16)	3,8 (14)	Ś = C (14)	10–20 (6, 21)		wertykulacja (14) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (6, 21)	PRZED i PO (6, 21, 28, 31)	A, F	
MAKOWATE (PAPAVERACEAE) *Papaver rhoeas* (mak polny)	A pola, pola uprawne, obszary naruszone (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	Ś = C (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	stratyfikacja chłodna i wertykulacja (1, 19, 32) brak specjalnych zabiegów (4, 14, 29)	PO (4)	A, D, E, F, G	
WIECHLINOWATE (POACEAE) *Agrostis tenuis* (mietlica pospolita)	trawniki, pastwiska (16)	0,07 (14)	Ś > C (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	brak światła hamuje kiełkowanie (1, 17–19) brak specjalnych zabiegów (10)	PO (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (wyczyniec polny)	A pola, otwarte siedliska (16)	0,9–1,6 (29, 34)	Ś = C (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	wertykulacja (14) poddanie działaniu 101 mg/L KNO3 (14) stratyfikacja ciepła (1) brak światła hamuje kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (34)	PRZED i PO (28, 34)	A	32

▼M6

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia [1] i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu [2]	Głębokość wysiewu (mm) [3]	Okres do wykiełkowania (dni) [4]	Specjalne zabiegi [5]	Badanie toksyczności [6]	Dostawcy nasion [7]	Inne odniesienia [8]
Avena fatua (owies głuchy)	A obszary uprawne, otwarte siedliska (16)	7–37,5 (14, 30)	Ś = C (14) Ś > C (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	wertykulacja (7, 32) brak światła hamuje kiełkowanie (1) stratyfikacja chłodna (1, 18) brak specjalnych zabiegów (6, 10, 14)	PRZED i PO (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (stokłosa dachowa)	A pola, pobocza dróg, grunty orne (16)	0,45–2,28 (14, 29)	Ś = C (14)	3 (29)		okres dojrzewania (1, 7, 32) kiełkowanie hamowane przez światło (1)) brak specjalnych zabiegów (14)	PRZED i PO (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (grzebienica pospolita)	P pola, pobocza dróg, otwarte siedliska (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	Ś = C (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (19) brak specjalnych zabiegów (14, 29)	PO (5)	A	
Digitaria sanguinalis (palusznik krwawy)	A pola, darń, otwarte siedliska (16)	0,52–0,6 (14, 30)	Ś = C (14)	10–20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	wertykulacja, stratyfikacja chłodna i dojrzewanie (1, 7, 14, 32) poddać działaniu 101 mg/L KNO3 (14) brak światła hamuje kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (21)	PRZED i PO (18, 25, 31)	A	
Echinochioa crusgalli (chwastnica jednostronna)	A (16)	1,5 (14)	Ś = C (14) Ś > C (3)	10–20 (7, 21)		wertykulacja (7, 32) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (3, 14, 21)	PRZED i PO (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (wydmuchrzyca kanadyjska)	P obszary nadbrzeżne, obszary naruszone (16)	4–5 (14, 30)	Ś = C (11)	1 (11)	14–28 (11)	brak specjalnych zabiegów (2, 11)	PO (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (kostrzewa łąkowa)	P pola, wilgotne obszary (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	Ś = C (14) Ś > C (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	brak specjalnych zabiegów (10, 19)	PO (10)	A	7

▼M6

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ([1]) i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ([2])	Głębokość wysiewu (mm) ([3])	Okres do wykiełkowania (dni) ([4])	Specjalne zabiegi ([5])	Badanie toksyczności ([6])	Dostawcy nasion ([7])	Inne odniesienia ([8])
Hordeum pusillum (gatunek jęczmienia)	A pastwiska, pobocza dróg, otwarte siedliska (16)	3,28 (14)				stratyfikacja ciepła (1) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1)	PRZED (31)		7
Phieum pratense (Timothy)	P pastwiska, pola uprawne, obszary naruszone (16, 19)	0,45 (14), 19	Ś > C (10, 14)	0–10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	brak światła hamuje kiełkowanie (19) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (17) brak specjalnych zabiegów (10, 14, 17, 19)	PO (10)	A, E	
RDESTOWATE (POLYGONACEAE) *Polygonum convolvulus* (rdestówka powojowata)	A otwarte siedliska, pobocza dróg (16)	5–8 (4, 14, 29)	Ś = C (20)	0–2 (4, 29)		stratyfikacja chłodna przez 4–8 tygodni (1, 2, 4, 20, 29) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1)	PRZED i PO 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (rdest szczawiolistny)	A wilgotna gleba (16)	1,8–2,5 (14)	Ś > C (6)		5 (94 %) (18)	natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1) brak światła hamuje kiełkowanie (18) stratyfikacja chłodna (1) brak specjalnych zabiegów (5)	PRZED i PO (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (rdest pensylwański)	A pola, otwarte siedliska (16)	3,6-7 (14, 29)		2 (29)		stratyfikacja chłodna przez 4 tygodnie w temperaturze 0–5 oC (1, 29) brak światła hamuje kiełkowanie (1)	PRZED (31)	A, E	
Polygonum periscaria (rdest plamisty)	A obszary naruszone, pola uprawne (16, 19)	2,1–2,3 (14, 19)	Ś > C (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	wertykulacja, stratyfikacja chłodna, poddanie działaniu GA (14) stratyfikacja chłodna, dojrzewanie (17–19) brak światła hamuje kiełkowanie (19) brak specjalnych zabiegów (13)	PO (13)	A	32

▼M6

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ([1]) i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ([2])	Głębokość wysiewu (mm) ([3])	Okres do wykiełkowania (dni) ([4])	Specjalne zabiegi ([5])	Badanie toksyczności ([6])	Dostawcy nasion ([7])	Inne odniesienia ([8])
Rumex crispus (szczaw kędzierzawy)	P grunty orne, pobocza dróg, otwarte obszary (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	Ś = C (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	brak światła hamuje kiełkowanie (18, 19) konieczne może być dojrzewanie (18) brak specjalnych zabiegów (4, 14, 33)	PO (4, 33)	A, E	32
PIERWIOSNKOWATE (-PRIMULACEAE) *Anagallis arvensis* (kurzyślad polny)	A grunty orne, otwarte obszary, obszary naruszone (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	Ś = C (14)		1 (50 %) (19)	stratyfikacja chłodna, poddanie działaniu kwasu giberelinowego (1, 14, 18, 19, 32) światło jest do kiełkowania konieczne (1) brak specjalnych zabiegów (2, 4)	PO (2,4)	A, F	
PIERWIOSNKOWATE (-RANUNCULACEAE) *Ranunculus acris* (jaskier ostry)	P grunty orne, pobocza dróg, otwarte obszary (16, 19)	1,5-2 (14, 19, 29)	Ś = C (14)	1 (29)	41–56 (19, 29)	brak specjalnych zabiegów (5, 14, 22, 24–26)	PO (5, 22, 24–26)		32
RÓŻOWATE (ROSACEAE) *Geum urbanum* (kuklik pospolity)	P żywopłoty, wilgotne obszary (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	Ś = C (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	brak światła hamuje kiełkowanie (18, 19) stratyfikacja ciepła (1) brak specjalnych zabiegów (5, 14, 22, 25, 26)	PO (5, 22, 25, 26)	A	
MARZANOWATE *(RUBIACEAE)* Galium aparine (przytulia czepna)	A grunty orne, wilgotne obszary, obszary naruszone (16, 19)	7-9 (14, 19)	Ś = C (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	stratyfikacja chłodna (1, 18, 19) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (18, 19) światło hamuje kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (6, 14)	PRZED i PO (6, 28)	A	32

▼M6

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia [1] i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu [2]	Głębokość wysiewu (mm) [3]	Okres do wykiełkowania (dni) [4]	Specjalne zabiegi [5]	Badanie toksyczności [6]	Dostawcy nasion [7]	Inne odniesienia [8]
Galium mollugo (przytulia pospolita)	P żywopłoty, otwarte obszary (8)	7 (29)	Ś = C (14)	2 (29)		brak specjalnych zabiegów (5, 14, 22, 24, 26, 29)	PO (5, 22, 24, 26)	A	
TRĘDOWNIKOWATE (SCROPHULARIACEAE) *Digitalis purpurea* (naparstnica purpurowa)	B, P żywopłoty, otwarte obszary (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	Ś = C (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	brak światła hamuje kiełkowanie (1, 17–19) brak specjalnych zabiegów (4, 22–26)	PO (4, 22–26)	D, G, F	
Veronica persica (przetacznik perski)	A grunty orne, otwarte obszary, obszary naruszone (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	Ś = C (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	brak światła hamuje kiełkowanie (18, 19) stratyfikacja chłodna (18) brak specjalnych zabiegów (14)	PRZED i PO (28)	A	32

([1]) A = rośliny jednoroczne, B = rośliny dwuletnie, P = rośliny wieloletnie.
([2]) Odniesienia 11, 14 i 33 wskazują na stosunek światła (Ś) do braku światła (C) konieczny do wywołania kiełkowania nasion. Odniesienia 3, 6, 9, 10, 13, 20 wskazują na warunki wzrostu w szklarniach.
([3]) 0 mm wskazuje, że nasiona wysiano na powierzchni gleby albo że nasiona potrzebują światła do kiełkowania.
([4]) Przedstawione liczby oznaczają liczbę dni do momentu wykiełkowania określonego odsetka nasion zgodnie z przedstawionymi odniesieniami np. 3 dni (50 %) kiełkowania (odniesienie 19).
([5]) Czas trwania dojrzewania lub stratyfikacji nie zawsze jest znany. Poza wymogami związanymi z utrzymywaniem chłodu warunki temperaturowe nie są sprecyzowane, ponieważ w przypadku badań w szklarni kontrolowanie temperatury jest ograniczone. Większość nasion wykiełkuje w warunkach normalnych zmian temperatury panujących w szklarniach.
([6]) Wskazuje, że gatunek został wykorzystany w badaniu toksyczności wobec roślin przed wzejściem (PRZED) lub po wzejściu (PO) obejmującym herbicydy.
([7]) Przedstawia przykładowych komercyjnych dostawców nasion.
([8]) Przedstawia dwie alternatywne pozycje literatury, do których się odwołano.

▼M6

Przywołani dostawcy nasion

Identyfikator dostawcy	Informacje o dostawcy
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ WIELKA BRYTANIA +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 STANY ZJEDNOCZONE (727) 344 – 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla – Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 KANADA (519) 586–3 985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 STANY ZJEDNOCZONE (303) 431–7 333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 STANY ZJEDNOCZONE (800) 873 – 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB WIELKA BRYTANIA +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 KANADA (800) 274 – 7333 www.thompson-morgan.com

PRZYWOŁANE POZYCJE LITERATURY

(1) Baskin, C.C. i Baskin J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto

(2) Blackburn, L.G. & 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): 2 532–2 541.

(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. W: Plants for toxicity assessment: tom 2. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, i M.A. Lewis, (red.). Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów, Filadelfia. s. 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, wyd. 3. 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. s. 151 – 156.

(11) Fiely M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Informacje własne. (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 (wersja 6.0, październik 2004 r.) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring J., Kempenaar C. i 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, wydanie 2. 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: 1 017–1 059.

(19) Grime J.P., Hodgson J.G. i Hunt R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., Londyn.

(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. i 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. s. 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. Informacje własne. (http://www.herbiseed.com)

(30) Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (USDA), Służba Ochrony Zasobów Naturalnych (NRCS). 2004. The Plants Database, wersja 3.5 (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 STANY ZJEDNOCZONE.

(31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych / Biuro Programów Pestycydowych / Wydział Losów i Skutków Środowiskowych / Dział Epidemiologii Środowiskowej].

(32) Webster, R.H. 1979. Sprawozdanie techniczne nr 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. Informacje własne.

(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**

Dodatek 4

Przykłady odpowiednich warunków wzrostu w przypadku niektórych gatunków roślin uprawnych

Następujące warunki uznano za odpowiednie w przypadku 10 gatunków roślin uprawnych – można je potraktować jako wytyczne na potrzeby badań w komorach wzrostu również w przypadku niektórych innych gatunków:

stężenie dwutlenku węgla: 350 ± 50 ppm;

wilgotność względna: 70 ± 5 % podczas okresów oświetlenia i 90 ± 5 % podczas okresów braku światła;

temperatura: 25 ± 3 °C w ciągu dnia, 20 ± 3 °C w nocy;

fotoperiod: 16 godz. światła / 8 godz. bez dostępu światła, przy średniej długości fali wynoszącej 400–700 nm;

światło: luminacja wynosząca 350 ± 50 $mE/m^2/s$, mierzona ponad roślinami.

Gatunki roślin uprawnych:

— pomidor (*Solanum lycopersicon*);

— ogórek (*Cucumis sativus*);

— sałata (*Lactuca sativa*);

— soja (*Glycine max*);

— kapusta (*Brassica oleracea var. capitata*);

— marchew (*Daucus carota*);

— owies zwyczajny (*Avena sativa*);

— życica trwała (*Lolium perenne*);

— kukurydza zwyczajna (*Zea mays*);

— cebula (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. BADANIE ROZRODCZOŚCI WAZONKOWCOWATYCH

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 220 (2004). Opracowana została w celu oceny wpływu działania substancji chemicznych na zdolność rozrodczą wazonkowcowatych, *Enchytraeus albidus* (Henle 1873), w glebie. Zasadniczo bazuje ona na metodzie opracowanej przez niemiecki Umweltbundesamt (1), która została poddana badaniu międzylaboratoryjnemu (2). Wzięto również pod uwagę inne metody badania toksyczności substancji chemicznych wobec wazonkowcowatych i dżdżownic (3)(4)(5)(6)(7)(8).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

2. Żyjące w glebie pierścienice z rodzaju wazonkowcowatych (Enchytraeus) są gatunkiem istotnym pod względem ekologicznym dla badań ekotoksykologicznych. Chociaż wazonkowce często występują w glebach zasiedlonych przez dżdżownice, prawdą jest również, iż często licznie występują one w wielu glebach, w których dżdżownice nie występują. Wazonkowce można stosować w badaniach laboratoryjnych, jak również w badaniach w warunkach terenowych lub zbliżonych do terenowych. Z praktycznego-punktu widzenia hodowla wielu gatunków wazonkowcowatych nie nastręcza trudności pod względem utrzymania i hodowli, a czas życia pokolenia jest znacznie krótszy niż w przypadku dżdżownic. Czas trwania badania rozrodczości wazonkowców wynosi więc zaledwie 4–6 tygodni, zaś w przypadku dżdżownic (Eisenia fetida) – 8 tygodni.

3. Podstawowe informacje dotyczące ekologii i ekotoksykologii wazonkowców w środowisku lądowym znaleźć można w (9)(10)(11)(12).

ZASADA BADANIA

4. Dorosłe osobniki wazonkowców poddaje się narażeniu na działanie szeregu stężeń substancji chemicznej wymieszanej ze sztuczną glebą. Badanie można podzielić na dwa etapy: a) badanie ustalające zakres stężeń (w przypadku gdy brakuje dostatecznych informacji), w którym śmiertelność stanowi główny punkt końcowy oceniany po dwóch tygodniach narażenia oraz b) ostateczne badanie rozrodczości, w którym ocenie podlega całkowita liczba młodych osobników wyprodukowanych przez zwierzę rodzicielskie oraz przeżycie zwierząt rodzicielskich. Czas trwania badania ostatecznego wynosi sześć tygodni. Po pierwszych trzech tygodniach usuwa się osobniki dorosłe i odnotowuje zmiany morfologiczne. Po kolejnych trzech tygodniach liczy się potomstwo wyklute z kokonów wyprodukowanych przez osobniki dorosłe. Zdolność rozrodczą zwierząt narażonych na badaną substancję chemiczną porównuje się z próbami kontrolnymi w celu określenia (i) stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub (ii) EC_x (np. EC_{10}, EC_{50}), stosując model regresji w celu oszacowania stężenia, które spowoduje zmniejszenie zdolności rozrodczej o x %. Badane stężenia powinny zawierać w swoim zakresie EC_x (np. EC_{10}, EC_{50}), aby EC_x wynikało raczej z interpolacji niż ekstrapolacji.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

5. W miarę możliwości należy znać rozpuszczalność w wodzie, log K_{ow}, współczynnik podziału gleba/woda (np. rozdziały C.18 lub C.19 niniejszego załącznika) oraz prężność pary badanej substancji chemicznej. Pożądane są dodatkowe informacje na temat losów badanej substancji chemicznej w glebie, takie jak wskaźniki fotolizy i hydrolizy.

6. Niniejszą metodę badawczą można stosować w odniesieniu do substancji chemicznych rozpuszczalnych albo nierozpuszczalnych w wodzie. Sposób zastosowania badanej substancji chemicznej będzie się jednak odpowiednio różnił. Metoda badawcza nie ma zastosowania do lotnych substancji chemicznych, np. substancji chemicznych, w odniesieniu do których stała Henry'ego lub współczynnik podziału powietrze/woda są większe niż jeden, lub substancji chemicznych, w odniesieniu do których prężność pary przekracza 0,0133 Pa w temperaturze 25 °C.

▼M6

WAŻNOŚĆ BADANIA

7. Aby badanie było ważne, powinny być spełnione następujące kryteria wykonania w przypadku prób kontrolnych:

— śmiertelność osobników dorosłych na koniec badania ustalającego zakres i po pierwszych trzech tygodniach badania rozrodczości nie powinna przekraczać 20 %,

— zakładając, że badanie rozpoczęto z 10 dorosłymi osobnikami na naczynie, na koniec badania powinno zostać wyprodukowanych średnio co najmniej 25 młodych osobników na naczynie,

— współczynnik zmienności w odniesieniu średniej liczby młodych osobników nie powinien być wyższy niż 50 % na koniec badania rozrodczości.

Jeżeli badanie nie spełni powyższych kryteriów ważności, należy je zakończyć, chyba że przedstawić można uzasadnienie kontynuacji badania. Uzasadnienie należy włączyć do sprawozdania z badania.

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

8. Substancję chemiczną odniesienia należy badać w równych odstępach czasu lub ewentualnie włączyć do każdego badania w celu zweryfikowania, czy reakcja organizmów użytych do badania nie zmieniła się znacznie z czasem. Odpowiednią substancją chemiczną odniesienia jest karbendazym, w przypadku którego wykazano wpływ na przeżycie i rozrodczość wazonkowców (13)(14), albo inne substancje chemiczne, w przypadku których dane dotyczące toksyczności są dobrze znane. W badaniu międzylaboratoryjnym zastosowano preparat karbendazymu znany pod nazwą handlową Derosal™, dostarczany przez AgrEvo Company (Frankfurt, Niemcy), zawierający 360 g/l (32,18 %) substancji czynnej (2). Określone w badaniu międzylaboratoryjnym EC_{50} dla rozrodczości mieściło się w zakresie 1,2 ± 0,8 mg substancji czynnej na kilogram suchej masy (2). Jeżeli badana seria obejmuje pozytywną normę toksyczną, stosuje się jedno stężenie i liczba kontrprób powinna być taka sama jak w przypadku prób kontrolnych. W przypadku karbendazymu zaleca się badanie 1,2 mg substancji czynnej na kilogram suchej masy (badanej w płynnej postaci).

OPIS BADANIA

Wyposażenie

9. Naczynia badawcze powinny być wykonane ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału. Odpowiednie są szklane słoje (np. o objętości 0,20–0,25 litra i średnicy ≈ 6 cm). Naczynia powinny mieć przezroczyste pokrywki (np. szklane lub z polietylenu), które mają ograniczyć parowanie wody, jednocześnie umożliwiając wymianę gazu między glebą a atmosferą. Pokrywki powinny być przezroczyste, aby zapewnić przepuszczalność światła.

10. Wymagane jest standardowe wyposażenie laboratoryjne, w szczególności następujące urządzenia:

— suszarka szafkowa;

— mikroskop stereoskopowy;

— pehametr i fotometr;

— odpowiednie dokładne wagi;

— odpowiedni sprzęt do regulacji temperatury;

— odpowiedni sprzęt do regulacji wilgotności (nie jest konieczny, jeżeli naczynia narażone na działanie substancji mają pokrywki);

— inkubator lub małe pomieszczenie z regulacją temperatury;

— pincety, haczyki lub ezy;

— kuweta fotograficzna.

Przygotowanie sztucznej gleby

11. W niniejszym badaniu zastosowano sztuczną glebę (5)(7) o następującym składzie (w oparciu o masy suche, suszone do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C):

▼M6

— 10 % torfu sfagnowego, suszonego na powietrzu i drobno zmielonego (dopuszczalna wielkość cząstek 2 ± 1 mm); zaleca się sprawdzenie, czy gleba przygotowana ze świeżą partią torfu nadaje się do hodowli organizmów przed zastosowaniem jej w badaniu;

— 20 % glinki kaolinowej (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);

— około 0,3–1,0 % węglanu wapnia (sproszkowanego $CaCO_3$ do analizy), aby otrzymać pH 6,0 ± 0,5; ilość dodawanego węglanu wapnia może zależeć przede wszystkim od jakości/rodzaju torfu;

— około 70 % kwarcowego piasku suszonego na powietrzu (w zależności od potrzebnej ilości $CaCO_3$), głównie drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek ma wymiary 50–200 mikronów.

W przypadku sztucznej gleby przed jej wykorzystaniem do badania ostatecznego należy wykazać jej przydatność do hodowli organizmów i stosowność pod względem spełnienia kryteriów ważności. Jest to zalecane zwłaszcza w celu upewnienia się, że przeprowadzenie badania nie zostanie zakłócone, jeżeli zawartość węgla organicznego w sztucznej glebie zmniejszy się, np. w wyniku obniżenia zawartości torfu do 4–5 % oraz odpowiedniego zwiększenia zawartości piasku. Dzięki takiemu zmniejszeniu zawartości węgla organicznego mogą zmniejszyć się możliwości adsorpcji badanej substancji chemicznej do gleby (węgiel organiczny), a dostępność badanej substancji chemicznej dla organizmów może wzrosnąć. Wykazano, że gatunek *Enchytraeus albidus* może spełniać kryteria ważności dotyczące rozrodczości, jeśli bada się go w glebach naturalnych o niższej zawartości węgla organicznego niż wymienione powyżej (np. 2,7 %) (15) oraz istnieją, ograniczone wprawdzie, doświadczenia pokazujące, że pozwala na to również zastosowanie sztucznej gleby przy zawartości torfu na poziomie 5 %.

Uwaga: W przypadku zastosowania gleby naturalnej w dodatkowych badaniach (np. wyższego rzędu) należy również określić przydatność gleby i stosowność pod względem spełnienia kryteriów ważności.

12. Suche składniki gleby dokładnie miesza się (np. w dużym mieszalniku laboratoryjnym). Taką czynność należy przeprowadzić przynajmniej tydzień przed rozpoczęciem badania. Wymieszaną glebę należy przechowywać przez dwa dni w celu zrównoważenia/ustabilizowania kwasowości. W celu określenia pH stosuje się mieszaninę gleby i 1-molowego roztworu chlorku potasu (KCl) lub 0,01-molowego roztworu chlorku wapnia ($CaCl_2$) w stosunku 1:5 (zob. (16) i dodatek 3). Jeżeli kwasowość gleby przekracza wymagany zakres (zob. pkt 11), można ją dostosować, dodając odpowiednią ilość $CaCO_3$. Jeżeli gleba jest zbyt zasadowa, można to skorygować, dodając większą ilość mieszaniny, o której mowa w pkt 11, lecz z wyłączeniem $CaCO_3$.

13. Maksymalną pojemność wodną sztucznej gleby ustala się zgodnie z procedurami określonymi w dodatku 2. Jeden lub dwa dni przed rozpoczęciem badania suchą sztuczną glebę nawilża się wstępnie, dodając odpowiednią ilość wody dejonizowanej w celu uzyskania około połowy końcowej zawartości wody, stanowiącej 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby. Na początku badania wstępnie nawilżoną glebę dzieli się na części odpowiadające liczbie badanych stężeń (i w stosownych przypadkach substancji chemicznych odniesienia) oraz prób kontrolnych zastosowanych w badaniu. Zawartość wilgoci dostosowuje się, aby osiągnąć 40–60 % maksymalnej

▼M6

pojemności wodnej gleby, dodając roztwór badanej substancji chemicznej lub wodę destylowaną albo dejonizowaną (zob. pkt 19–21). Zawartość wilgoci określa się na początku i na końcu badania (w wyniku suszenia do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C) i powinna ona mieścić się w przedziale optymalnym dla przetrwania organizmów. Przybliżoną ocenę zawartości wilgoci w glebie można wykonać, ściskając glebę delikatnie w rękach – jeżeli zawartości wilgoci w glebie jest odpowiednia, pomiędzy palcami powinny pojawić się małe krople wody.

Wybór i przygotowanie zwierząt użytych do badania

14. Zaleca się wykorzystanie w badaniu gatunku *Enchytraeus albidus* (Henle 1837) (wazonkowiec biały), należącego do rodziny *Enchytraeidae* (rząd *Oligochaeta*, typ *Annelida*). *E. albidus* jest jednym z największych gatunków wazonkowców – odnotowano osobniki o długości do 35 mm (17)(18). *E. albidus* występuje na całym świecie, w siedliskach morskich, słodkowodnych i lądowych, głównie w rozkładającej się materii organicznej (wodorosty, kompost) oraz rzadziej na łąkach (9). Duża tolerancja ekologiczna tego gatunku oraz niektóre różnice morfologiczne mogą wskazywać na istnienie różnych ras.

15. *E. albidus* jest dostępny w handlu jako karma dla ryb. Należy sprawdzić, czy hodowla jest zanieczyszczona innymi, zazwyczaj mniejszymi, gatunkami (1) (19). Jeśli zanieczyszczenie występuje, wszystkie organizmy należy wypłukać w wodzie w szalce Petriego. Następnie w celu rozpoczęcia nowej hodowli wybiera się duże dorosłe osobniki z gatunku *E. albidus* (przy użyciu mikroskopu stereoskopowego), a wszystkie inne organizmy odrzuca się. Gatunek *E. albidus* można z łatwością hodować w wielu różnych materiałach organicznych (zob. dodatek 4). Cykl życia *E. albidus* jest krótki, ponieważ organizmy osiągają dojrzałość w okresie od 33 dni (przy temperaturze 18 °C) do 74 dni (przy temperaturze 12 °C) (1). W badaniu wykorzystuje się wyłącznie hodowle utrzymywane w laboratorium bez żadnych problemów przez co najmniej 5 tygodni (jedno pokolenie).

16. Inne gatunki z rodzaju *Enchytraeus* również nadają się do wykorzystania w badaniu np. *E. buchholzi* (Vejdovsky 1879) lub *E. crypticus* (Westheide i Graefe 1992) (zob. dodatek 5). W przypadku wykorzystania innych gatunków *Enchytraeus* należy je wyraźnie zidentyfikować oraz uzasadnić taki wybór.

17. Do badań używa się osobników dorosłych. Powinny one posiadać jaja (białek plamki) w okolicach siodełka i powinny być w przybliżeniu tej samej wielkości (około 1 cm długości). Synchronizacja hodowli nie jest konieczna.

18. Jeżeli wazonkowców nie hoduje się w tego samego rodzaju glebie i w tych samych warunkach (włącznie z karmieniem) co wykorzystane w ostatecznym badaniu, organizmy należy aklimatyzować przez co najmniej 24 godziny do trzech dni. Początkowo aklimatyzować należy większą liczbę dorosłych osobników niż liczba konieczna do przeprowadzenia badania, aby umożliwić ewentualne odrzucenie uszkodzonych lub nienadających się z innych względów osobników. Na koniec okresu aklimatyzacji do badania wybiera się tylko organizmy posiadające jaja oraz niewykazujące żadnych anomalii w zachowaniu (np. próba ucieczki z gleby). Organizmy te ostrożnie usuwa się za pomocą pęset jubilerskich, haczyków lub ez i umieszcza w szalce Petriego zawierającej niewielką ilość wody słodkiej. Jak zasugerowano w rozdziale C.20 niniejszego załącznika (Badanie rozrodczości gatunku *Daphnia magna*), zaleca się zastosowanie w tym celu regenerowanej wody słodkiej, ponieważ woda dejonizowana, demineralizowana lub wodociągowa może być szkodliwa dla organizmów. Organizmy bada się pod mikroskopem stereoskopowym i odrzuca się wszystkie, które nie zawierają jaj. Należy zwrócić uwagę, aby usunąć i odrzucić wszelkie roztocza lub skoczogonki, które mogły zanieczyścić hodowle. Zdrowe osobniki niewykorzystane do badania umieszcza się z powrotem w hodowli wyjściowej.

▼M6

Przygotowywanie badanych stężeń

Badana substancja chemiczna rozpuszczalna w wodzie

19. Roztwór badanej substancji chemicznej przygotowuje się w wodzie dejonizowanej w ilości wystarczającej do wszystkich kontrprób w ramach jednego badanego stężenia. Zaleca się zastosowanie odpowiedniej ilości wody, aby osiągnąć wymaganą wilgotność, tj. 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby (zob. pkt 13). Przed wprowadzeniem do naczynia badawczego każdy roztwór badanej substancji chemicznej dokładnie miesza się z jedną partią wstępnie nawilżonej gleby.

Badana substancja chemiczna nierozpuszczalna w wodzie

20. W przypadku substancji chemicznych nierozpuszczalnych w wodzie, ale rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych, badaną substancję chemiczną można rozpuścić w jak najmniejszej ilości odpowiedniego nośnika (np. acetonu). Należy stosować jedynie lotne rozpuszczalniki. Nośnik natryskuje się na niewielką ilość, na przykład 2,5 g, drobnego piasku kwarcowego albo miesza się go z piaskiem. Nośnik usuwa się, odparowując go przez co najmniej godzinę pod okapem wyciągowym. Tę mieszaninę piasku kwarcowego i badanej substancji chemicznej dodaje się do wstępnie nawilżonej gleby i dokładnie miesza po dodaniu odpowiedniej ilości wody dejonizowanej w celu osiągnięcia wymaganej wilgotności. Otrzymaną mieszaninę umieszcza się w naczyniach badawczych.

21. W przypadku substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych miesza się odpowiednią ilość badanej substancji chemicznej z ekwiwalentem 2,5 g drobno zmielonego piasku kwarcowego na jedno naczynie badawcze w celu otrzymania pożądanego badanego stężenia. Taką mieszaninę piasku kwarcowego i badanej substancji chemicznej dodaje się do wstępnie nawilżonej gleby i dokładnie miesza po dodaniu odpowiedniej ilości wody dejonizowanej w celu osiągnięcia wymaganej wilgotności. Otrzymaną mieszaninę przekłada się do naczyń badawczych. Procedurę tę powtarza się dla każdego badanego stężenia, a także przygotowuje się odpowiednią próbę kontrolną.

22. Substancji chemicznych nie należy zazwyczaj badać w stężeniach wyższych niż 1 000 mg/kg suchej masy gleby. Badanie wyższych stężeń może być jednak konieczne ze względu na cele danego badania.

WYKONANIE BADAŃ

Grupy badane i kontrolne

23. W przypadku każdego badanego stężenia w naczyniu badawczym umieszcza się ilość badanej gleby odpowiadającą 20 g suchej masy (zob. pkt 19–21). Przygotowuje się również próby kontrolne niezawierające badanej substancji chemicznej. Do każdego z naczyń dodaje się pokarm zgodnie z procedurami opisanymi w pkt 29. Do każdego naczynia badawczego losowo przydziela się dziesięć organizmów. Organizmy przenosi się ostrożnie do każdego z naczyń badawczych i umieszcza na powierzchni gleby za pomocą na przykład pincet jubilerskich, haczyków lub ez. Liczba kontrprób w odniesieniu do badanych stężeń oraz w odniesieniu do prób kontrolnych zależy od zastosowanego projektu badania (zob. pkt 34). Naczynia badawcze rozmieszcza się losowo w inkubatorze badawczym i losowo zmienia ich położenie raz na tydzień.

24. Jeżeli zastosowano nośnik w celu dodania badanej substancji chemicznej, oprócz serii badanej należy przygotować jedną serię prób kontrolnych zawierających piasek kwarcowy spryskany rozpuszczalnikiem lub z nim wymieszany. Stężenie rozpuszczalnika lub środka dyspergującego powinno być takie samo jak stężenie zastosowane w naczyniach badawczych zawierających badaną substancję chemiczną. Serię kontrolną zawierającą dodatkowy piasek kwarcowy (2,5 g na naczynie) należy zbadać pod kątem substancji chemicznych, które wymagają wprowadzenia zgodnie z procedurami opisanymi w pkt 21.

▼M6

Warunki badania

25. Badanie przeprowadza się w temperaturze 20 ± 2 °C. Aby zapobiec ucieczce organizmów z gleby, badanie przeprowadza się w warunkach kontrolowanych cykli światło–ciemność (najlepiej 16 godzin światła i 8 godzin bez dostępu światła) z natężeniem światła na obszarze z naczyniami badawczymi na poziomie 400–800 luksów.

26. W celu kontrolowania wilgotności gleby naczynia waży się na początku badania, a następnie raz w tygodniu. Utratę masy uzupełnia się, dodając odpowiednią ilość wody dejonizowanej. Należy zauważyć, że utratę wody można ograniczyć dzięki utrzymaniu wysokiej wilgotności powietrza (> 80 %) w inkubatorze badawczym.

27. Zawartość wilgoci i pH należy mierzyć na początku i na końcu badania ustalającego zakres stężeń i badania ostatecznego. Pomiary należy wykonać w próbach kontrolnych i próbach gleby poddanych zabiegowi (wszystkie stężenia), przygotowanych i utrzymywanych w taki sam sposób jak badane hodowle, ale niezawierających organizmów. Pokarm należy dodać do tych próbek gleby tylko na początku badania w celu ułatwienia aktywności mikroorganizmów. Należy dodać taką samą ilość pokarmu jak w przypadku badanych hodowli. Dodawanie więcej pokarmu do tych naczyń podczas badania nie jest konieczne.

Karmienie

28. Można zastosować pokarm umożliwiający utrzymanie populacji wazonkowców. Stwierdzono, że odpowiedni pokarm stanowią płatki owsiane, najlepiej przed zastosowaniem poddane obróbce w autoklawie (właściwe jest również podgrzewanie) w celu uniknięcia zanieczyszczeń mikrobiologicznych.

29. Pokarm jest podawany w ten sposób, że przed wprowadzeniem organizmów najpierw w każdym naczyniu jest mieszane 50 mg zmielonych płatków owsianych z glebą. Następnie pokarm podaje się raz w tygodniu aż do 21. dnia. W 28. dniu nie podaje się pokarmu, ponieważ osobniki dorosłe zostały już na tym etapie usunięte, a młode osobniki potrzebują od tego momentu stosunkowo mało dodatkowego pokarmu. Karmienie podczas badania polega na ostrożnym umieszczeniu na powierzchni gleby 25 mg zmielonych płatków owsianych, tak aby uniknąć uszkodzenia organizmów. W celu ograniczenia rozwoju grzybów płatki owsiane należy zakopać w glebie, przykrywając niewielkimi ilościami gleby. Jeżeli pokarm nie zostaje zjedzony, dawkę należy zmniejszyć.

Projekt badania ustalającego zakres

30. W stosownych przypadkach przeprowadza się badanie ustalające zakres, stosując np. pięć stężeń badanej substancji chemicznej wynoszących 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg (suchej masy gleby). Jedna kontrpróba dla każdej grupy badanej i kontrolnej jest wystarczająca.

31. Badanie ustalające zakres trwa dwa tygodnie. Po zakończeniu badania określa się śmiertelność organizmów. Organizm odnotowuje się jako martwy, jeżeli przedni koniec ciała nie wykazuje żadnej reakcji na bodźce mechaniczne. Dodatkowe informacje dotyczące śmiertelności mogą okazać się przydatne również przy podejmowaniu decyzji dotyczącej zakresu stężeń, jakie mają zostać użyte w badaniu ostatecznym. Należy w związku z tym odnotować również wszelkie zmiany w zachowaniu (np. niezdolność zakopywania się w glebie; leżenie w bezruchu przy szklanej ściance naczynia badawczego) i w morfologii (np. występowanie otwartych ran) osobników dorosłych, jak również występowanie ewentualnych młodych. Tę ostatnią informację można ustalić, stosując metodę barwienia opisaną w dodatku 6.

32. LC_{50} można w przybliżeniu określić, obliczając średnią geometryczną danych dotyczących śmiertelności. Przy wyznaczaniu zakresu stężeń do badania ostatecznego zakłada się, że wpływ na rozrodczość jest niższy niż LC_{50} o krotność nieprzekraczającą 10. Jest to jednak zależność empiryczna i może się ona różnić w szczególnych przypadkach. Dodatkowe obserwacje

▼M6

poczynione w badaniu ustalającym zakres, takie jak występowanie osobników młodych, mogą pomóc udoskonalić zakres stężeń badanej substancji chemicznej, który zostanie wykorzystany w badaniu ostatecznym.

33. W celu dokładnego wyznaczenia LC_{50} zaleca się przeprowadzenie badania z zastosowaniem co najmniej czterech kontrprób każdego stężenia badanej substancji chemicznej oraz odpowiedniej liczby stężeń, tak aby uzyskać co najmniej cztery statystycznie istotnie różne średnie reakcje przy tych stężeniach. W przypadku prób kontrolnych, jeżeli zostały one wykorzystane, stosuje się podobną liczbę stężeń i kontrprób.

Projekt ostatecznego badania rozrodczości

34. W oparciu o zalecenia wynikające z badania międzylaboratoryjnego proponowane są trzy układy (2):

— w celu wyznaczenia NOEC należy zbadać co najmniej pięć stężeń uporządkowanych w szereg geometryczny. Zaleca się cztery kontrpróby dla każdego badanego stężenia i dodatkowo osiem prób kontrolnych. Kolejne stężenie nie powinno być większe niż 1,8-krotność poprzedniego;

— W celu określenia EC_x (np. EC_{10}, EC_{50}) należy zbadać co najmniej pięć stężeń, które powinny zawierać w swoim zakresie EC_x w celu umożliwienia interpolacji, a nie ekstrapolacji EC_x. Zaleca się zastosowanie co najmniej czterech kontrprób dla każdego badanego stężenia oraz czterech kontrprób kontrolnych. Współczynnik rozstawienia stężeń może być zróżnicowany, tj. może być równy lub mniejszy niż 1,8 w oczekiwanym przedziale skutków oraz może przekraczać 1,8 przy wyższych i niższych stężeniach;

— połączone podejście umożliwia wyznaczenie zarówno NOEC, jak i EC_x. Należy zastosować osiem badanych stężeń uporządkowanych w szeregu geometrycznym. Zaleca się cztery kontrpróby dla każdego zabiegu i dodatkowo osiem prób kontrolnych. Kolejne stężenie nie powinno być większe niż 1,8-krotność poprzedniego;

35. Należy zastosować dziesięć osobników dorosłych na naczynie badawcze (zob. pkt 23). Pokarm dodaje się do naczyń badawczych w momencie rozpoczęcia badania, a następnie raz w tygodniu (zob. pkt 29) do 21. dnia włącznie. W 21. dniu próbki gleby dokładnie przeszukuje się ręcznie, a żyjące osobniki dorosłe poddaje się obserwacji, liczy i odnotowuje wszelkie zmiany w zachowaniu (np. niezdolność zakopywania się w glebie; leżenie w bezruchu przy szklanej ściance naczynia badawczego) i w morfologii (np. otwarte rany). Następnie wszystkie osobniki dorosłe usuwa się z naczyń badawczych i badanej gleby. Badaną glebę zawierającą jakiekolwiek wyprodukowane kokony inkubuje się przez trzy kolejne tygodnie w takich samych warunkach badania, z tym że pokarm podaje się tylko w 35. dniu (tj. 25 mg zmielonych płatków owsianych na naczynie).

36. Po sześciu tygodniach liczy się nowo wyklute osobniki. Zaleca się zastosowanie metody opartej na barwieniu różem bengalskim (zob. dodatek 6), chociaż odpowiednie okazały się również inne metody ekstrakcji i flotacji na mokro (ale bez ogrzewania) (zob. dodatek 6) (4)(10)(11)(20). Zaleca się zastosowanie barwienia różem bengalskim, ponieważ ekstrakcja na mokro z podłoża glebowego może zostać utrudniona przez zmętnienie spowodowane zawieszonymi cząstkami gliny.

Badanie graniczne

37. Jeżeli w badaniu ustalającym zakres nie zaobserwowano żadnych efektów przy najwyższym stężeniu (tj. 1 000 mg/kg), jako badanie graniczne można przeprowadzić badanie rozrodczości, stosując stężenie 1 000 mg/kg, w celu wykazania, że NOEC w przypadku rozrodczości jest wyższe niż ta wartość.

▼M6

Streszczenie i harmonogram badania

38. Etapy badania można podsumować następująco:

Czas	Badanie ustalające zakres stężeń	Badanie ostateczne
Dzień – 7 lub wcześniej	— przygotowanie sztucznej gleby (wymieszanie suchych składników)	— przygotowanie sztucznej gleby (wymieszanie suchych składników)
Dzień – 5	— sprawdzenie pH sztucznej gleby — dokonanie pomiaru maksymalnej pojemności wodnej gleby	— sprawdzenie pH sztucznej gleby — dokonanie pomiaru maksymalnej pojemności wodnej gleby
Dzień – 5 do – 3	— sortowanie organizmów w celu aklimatyzacji	— sortowanie organizmów w celu aklimatyzacji
Dni od – 3 do 0	— aklimatyzowanie organizmów przez co najmniej 24 godz.	— aklimatyzowanie organizmów przez co najmniej 24 godz.
Dzień – 1	— wstępne nawilżenie sztucznej gleby i rozmieszczenie jej w partiach	— wstępne nawilżenie sztucznej gleby i rozmieszczenie jej w partiach
Dzień 0	— sporządzenie roztworów podstawowych — wprowadzenie badanej substancji chemicznej — odważenie podłoża badawczego do naczyń badawczych — wmieszanie pokarmu — wprowadzenie organizmów — dokonanie pomiaru pH i wilgotności gleby	— sporządzenie roztworów podstawowych — wprowadzenie badanej substancji chemicznej — odważenie podłoża badawczego do naczyń badawczych — wmieszanie pokarmu — wprowadzenie organizmów — dokonanie pomiaru pH i wilgotności gleby
Dzień 7	— sprawdzenie zawartości wilgoci w glebie	— sprawdzenie zawartości wilgoci w glebie — karmienie
Dzień 14	— określenie śmiertelności osobników dorosłych — oszacowanie liczby osobników młodych — dokonanie pomiaru pH i wilgotności gleby	— sprawdzenie zawartości wilgoci w glebie — karmienie
Dzień 21		— obserwacja zachowań osobników dorosłych — usunięcie osobników dorosłych — określenie śmiertelności osobników dorosłych — sprawdzenie zawartości wilgoci w glebie — karmienie
Dzień 28		— sprawdzenie zawartości wilgoci w glebie — brak karmienia
Dzień 35		— sprawdzenie zawartości wilgoci w glebie — karmienie
Dzień 42		— liczenie młodych osobników — dokonanie pomiaru pH i wilgotności gleby

▼M6

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

39. Oprócz przeglądu zamieszczonego w dodatku 7 w ramach niniejszej metody badawczej nie podaje się żadnych definitywnych wytycznych statystycznych na potrzeby analizy wyników badania.

40. W badaniu ustalającym zakres głównym punktem końcowym jest śmiertelność. Należy jednak odnotować również wszelkie zmiany w zachowaniu (np. niezdolność zakopywania się w glebie; leżenie w bezruchu przy szklanej ściance naczynia badawczego) i w morfologii (np. otwarte rany) osobników dorosłych, jak również ewentualne występowanie młodych. W celu wyznaczenia LC_{50} zwykle stosuje się analizę probitową (21) albo regresję logistyczną. Niemniej w przypadkach, w których ta metoda analizy jest nieodpowiednia (np. jeśli dostępne są mniej niż trzy stężenia, które doprowadziły do częściowej śmiertelności), można zastosować alternatywne metody. Wspomniane metody mogą obejmować średnie kroczące (22), uproszczoną metodę Spearmana-Kärbera (23) albo prostą interpolację (np. średnia geometryczna LC_0 i LC_{100}, obliczona jako pierwiastek kwadratowy LC_0 pomnożony przez LC_{100}).

41. W badaniu ostatecznym punktem końcowym jest płodność (tj. liczba wyklutych młodych). Podobnie jak w przypadku badania ustalającego zakres wszystkie pozostałe objawy szkodliwości należy jednak również odnotować w sprawozdaniu końcowym. Do celów analizy statystycznej dotyczącej rozrodczości wymagane jest obliczenie średniej arytmetycznej oraz odchylenia standardowego w odniesieniu do grupy badanej i grupy kontrolnej.

42. Jeżeli przeprowadzono analizę wariancji, odchylenie standardowe (s) i stopnie swobody (df) można zastąpić odpowiednio połączonym oszacowaniem wariancji uzyskanym z analizy wariancji i jego stopniem swobody, pod warunkiem że wariancja nie jest uzależniona od stężenia. W takim przypadku należy zastosować pojedyncze wariancje grupy kontrolnej i grup badanych. Wartości te oblicza się zwykle za pomocą dostępnego na rynku oprogramowania statystycznego, stosując wyniki uzyskane w odniesieniu do naczynia jako kontrpróby. Jeżeli zasadne wydaje się łączenie danych na potrzeby prób kontrolnych negatywnych i prób kontrolnych z rozpuszczalnikiem zamiast badania pod kątem jednej z nich, należy zbadać te dane, aby sprawdzić, czy nie są one wyraźnie odmienne (w celu ustalenia odpowiednich badań zob. pkt 45 i dodatek 7).

43. Dalsze badanie i wnioskowanie statystyczne jest uzależnione od tego, czy wartości kontrpróby są normalnie rozłożone i jednorodne w odniesieniu do ich wariancji.

Oszacowanie NOEC

44. Preferowane powinno być stosowanie silnych testów. Należy korzystać z informacji np. wynikających z wcześniejszych doświadczeń z badaniami międzylaboratoryjnymi lub z innych danych historycznych dotyczących tego, czy dane są w przybliżeniu normalnie rozłożone. Istotniejsza jest jednorodność wariancji (homoskedastyczność). Jak pokazuje doświadczenie, wariancja często wzrasta wraz z rosnącą średnią. W takich przypadkach transformacja danych może doprowadzić do homoskedastyczności. Transformacja taka powinna się jednak raczej opierać na doświadczeniu związanym z historycznymi danymi niż na danych będących przedmiotem analizy. W przypadku danych jednorodnych należy przeprowadzić wielokrotne testy t-Studenta, takie jak test Williamsa ($\alpha = 0{,}05$, jednostronny) (24)(25) albo w niektórych przypadkach test Dunnetta (26)(27). Należy zaznaczyć, że w przypadku nierównej replikacji wartości (t) z tabeli trzeba skorygować, jak sugerują Dunnett i Williams. Niekiedy ze względu na dużą wariancję reakcje nie wzrastają/zmniejszają się regularnie. W takim przypadku dużego odchylenia od monotoniczności bardziej odpowiedni jest test Dunnetta. Jeżeli występują odchylenia od homoskedastyczności, zasadne może być dokładniejsze zbadanie możliwego wpływu na wariancje w celu

▼M6

ustalenia, czy można zastosować testy t-Studenta bez zbytniej utraty mocy statystycznej (28). Ewentualnie można zastosować wielokrotny test Manna-Whitneya, np. z korektą Bonferroniego według Holma (29), albo test nieparametryczny [np. test Jonckheere'a-Terpstry (30)(31) lub Shirleya (32) (33)] w przypadku gdy dane te przejawiają heteroskedastyczność, ale poza tym są spójne z podstawową monotoniczną zależnością dawka-odpowiedź, i zasadniczo testy te są preferowane w stosunku do testów t-Studenta dla nierównych wariancji (zob. również schemat w dodatku 7).

45. Jeżeli przeprowadzono badanie graniczne i warunki wstępne dotyczące parametrycznych procedur testów (normalność, jednorodność) są spełnione, można zastosować test t-Studenta w parach albo procedurę testu Manna-Whitneya (29).

Oszacowanie EC_x

46. W celu obliczenia dowolnej wartości EC_x po uzyskaniu odpowiedniej funkcji dawka-odpowiedź wykorzystuje się średnie z poszczególnych zabiegów do analizy regresji (liniowej albo nieliniowej). W odniesieniu do wzrostu osobników jako reakcji ciągłej wartości EC_x można oszacować, stosując odpowiednią analizę regresji (35). Wśród odpowiednich funkcji dla danych binarnych (śmiertelność/przeżycie oraz liczba potomstwa) znajdują się normalne funkcje: sigmoidalna, logistyczna lub Weibulla, zawierające dwa do czterech parametrów, z których część może również modelować reakcje hormetyczne. Jeżeli funkcję dawka-odpowiedź dopasowano za pomocą analizy regresji liniowej, przed oszacowaniem EC_x należy ustalić wysokie r^2 (współczynnik determinacji) lub nachylenie za pomocą analizy regresji, wstawiając wartość odpowiadającą x % średniej wartości próby kontrolnej do równania otrzymanego w wyniku analizy regresji. Granice ufności na poziomie 95 % oblicza się zgodnie z metodą Fiellera (przytoczoną przez Finneya (21)) lub innymi odpowiednimi współczesnymi metodami.

47. Ewentualnie reakcję modeluje się jako odsetek lub proporcję modelowego parametru, który interpretuje się jako średnią reakcję próby kontrolnej. W takich przypadkach normalną krzywą sigmoidalną (logistyczną, Weibulla) można często z łatwością dopasować do wyników, wykorzystując procedurę regresji probitowej (21). W takich przypadkach funkcję wagi trzeba dostosować na potrzeby odpowiedzi metrycznych, jak podaje Christensen (36). Jeżeli jednak zaobserwowano hormezę, analizę probitową należy zastąpić czteroparametrową funkcją logistyczną lub Weibulla, dopasowaną za pomocą procedury regresji nieliniowej (36). Jeżeli dopasowanie odpowiedniej funkcji dawka-odpowiedź do danych nie jest możliwe, wówczas do oszacowania EC_x i jego granic ufności można zastosować alternatywne metody, takie jak średnie kroczące za Thompsonem (22) i uproszczona procedura Spearmana-Kärbera (23).

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

48. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje.

Badana substancja chemiczna:

— właściwości fizyczne oraz w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (np. rozpuszczalność w wodzie, prężność pary);

— tożsamość chemiczna badanej substancji chemicznej zgodnie z nomenklaturą IUPAC, numer CAS, partia, seria, wzór strukturalny i stopień czystości;

— termin ważności próbki.

Badany gatunek:

— zwierzęta użyte do badania: gatunek, nazwa systematyczna, źródło organizmów i warunki hodowli.

Warunki badania:

— składniki i przygotowanie sztucznej gleby;

▼M6

— metoda podania badanej substancji chemicznej;

— opis warunków badania obejmujący temperaturę, wilgotność, pH itd.;

— dokładny opis projektu doświadczenia i procedur.

Wyniki badania:

— śmiertelność osobników dorosłych po dwóch tygodniach badania i liczba młodych osobników na koniec badania ustalającego zakres;

— śmiertelność osobników dorosłych po trzech tygodniach narażenia i dokładny wykaz młodych osobników na koniec badania ostatecznego;

— wszelkie zaobserwowane symptomy fizyczne lub patologiczne oraz zmiany w zachowaniu organizmów użytych do badania;

— wartości LC_{50}, NOEC lub EC_x (np. EC_{50}, EC_{10}) w odniesieniu do rozrodczości, jeżeli niektóre z nich mają zastosowanie z przedziałami ufności oraz wykres dopasowanego modelu użyty do ich obliczenia, wszystkie informacje i obserwacje pomocne w interpretacji wyników.

Odchylenia od procedur opisanych w niniejszej metodzie badawczej oraz wszelkie nietypowe zdarzenia, jakie miały miejsce podczas badania.

BIBLIOGRAFIA

(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, 150 + 223 s.

(3) Westheide, W. i Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, W: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Esser G. i Overdieck, D. (red.) s. 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. 46 s.

(5) Rozdział C.8 niniejszego załącznika. Toksyczność dla dżdżownic.

(6) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, nr 11268-1. ISO, Genewa.

(7) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, nr 11268-2 ISO, Genewa. ISO, Genewa.

(8) Rundgren S. i A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). W: Løkke, H. i C.A.M. Van Gestel, 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, Nowy Jork.

▼**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. W: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden S., Erb R., Dott W. i Eisentraeger A. (red.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59–81.

(16) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1994). Soil Quality – Determination of pH, nr 10390. ISO, Genewa.

(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 (wydanie 3.), s. 19–76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, Londyn.

(23) Hamilton M.A., R.C. Russo i R.V. Thurston. (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 F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. Wydanie 2. W.H. Freeman and Company. Nowy Jork.

(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 J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25–32.

▼M6

Dodatek 1

Definicje

Do celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

EC_x (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływu na organizmy użyte do badania w danym okresie narażenia, w porównaniu z próbą kontrolną. W niniejszym badaniu wszystkie stężenia powodujące zmiany wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby.

LC_0 (stężenie niepowodujące skutków śmiertelnych) to stężenie badanej substancji chemicznej, które nie prowadzi do śmierci żadnego z organizmów użytych do badania, narażonych na działanie tej substancji przez określony czas. W niniejszym badaniu LC_0 wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby.

LC_{50} (mediana stężenia śmiertelnego) to stężenie badanej substancji chemicznej, które prowadzi do śmierci 50 % organizmów użytych do badania, narażonych na działanie tej substancji przez określony czas. W niniejszym badaniu LC_{50} wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby.

LC_{100} (stężenie całkowicie śmiertelne) to stężenie badanej substancji chemicznej, które prowadzi do śmierci 100 % organizmów użytych do badania, narażonych na działanie tej substancji przez określony czas. W niniejszym badaniu LC_{100} wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby.

LOEC (najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany) oznacza najniższe stężenie badanej substancji chemicznej mające statystycznie istotny skutek ($p < 0,05$). W niniejszym badaniu LOEC wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby. Wszystkie badane stężenia wyższe niż LOEC powinny normalnie wykazywać skutek, który różni się statystycznie od próby kontrolnej. Wszelkie odchylenia od powyższego podczas identyfikacji LOEC muszą być uzasadnione w sprawozdaniu z badania.

NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian) oznacza najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej bezpośrednio poniżej LOEC, przy którym nie obserwuje się żadnych zmian. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające NOEC nie ma statystycznie istotnego skutku ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia, jeżeli porówna się je z próbą kontrolną.

Wskaźnik rozrodczości oznacza średnią liczbę młodych organizmów na daną liczbę osobników dorosłych w czasie trwania badania.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M6

Dodatek 2

Określanie maksymalnej pojemności wodnej gleby

Określanie pojemności wodnej sztucznej gleby

Następująca metoda została uznana za odpowiednią. Została ona opisana w załączniku C do normy ISO DIS 11268-2.

Pobrać określoną ilość (np. 5 g) badanej gleby z podłoża za pomocą odpowiedniego przyrządu (wybieraka ślimakowego itp.). Przykryć dno wybieraka kawałkiem bibuły filtracyjnej, a następnie, po napełnieniu wodą, umieść wybierak na stelażu w łaźni wodnej. Wybierak należy stopniowo zanurzać aż do momentu, gdy poziom wody znajdzie się powyżej powierzchni gleby. Następnie należy zostawić go w wodzie na około trzy godziny. Ponieważ nie cała woda wchłonięta przez kapilary w glebie może zostać zatrzymana, należy umieścić wybierak na podłożu z wilgotnego drobno zmielonego piasku kwarcowego umieszczonego w zamkniętym naczyniu (aby zapobiec wysychaniu) na dwie godziny w celu odsączenia próbki gleby. Próbkę należy następnie zważyć, wysuszyć do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C. Pojemność wodną gleby (WHC) można następnie obliczyć w następujący sposób:

$$\text{WHC (w \% suchej masy)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

gdzie:

S = podłoże nasycone wodą + masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej

T = tara (masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej)

D = sucha masa podłoża

BIBLIOGRAFIA:

ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, nr 11268-2 ISO, Genewa. ISO, Genewa.

▼**M6**

Dodatek 3

Określenie pH gleby

Podana poniżej metoda określania pH gleby opiera się na opisie zawartym w normie ISO 10390 (Jakość gleby – Oznaczanie pH).

Określoną ilość gleby suszy się w temperaturze pokojowej przez co najmniej 12 godzin. Następnie sporządza się zawiesinę gleby (zawierającą co najmniej 5 gramów gleby) w 1-molowym roztworze chlorku potasu czystego do analizy (KCl) lub 0,01-molowym roztworze chlorku wapnia czystego do analizy ($CaCl_2$) o objętości pięciokrotnie większej od objętości gleby. Otrzymaną zawiesinę wytrząsa się przez pięć minut. Następnie zawiesinę odstawia się do osadzenia na co najmniej 2 godziny, ale nie na dłużej niż 24 godziny. W fazie ciekłej pH mierzy się za pomocą pehametru, który jest kalibrowany przed każdym pomiarem przy użyciu odpowiedniego szeregu roztworów buforowych (np. pH 4,0 i 7,0).

BIBLIOGRAFIA:

ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1994). Soil Quality – Determination of pH, nr 10390. ISO, Genewa.

▼M6

Dodatek 4

Warunki hodowli *Enchytraeus sp.*

Organizmy z gatunku *Enchytraeus albidus* (a także inne gatunki z rodzaju *Enchytraeus*) można hodować w dużych skrzyniach z tworzywa sztucznego (np. o wymiarach 30 × 60 × 10 cm) wypełnionych mieszaniną gleby sztucznej i naturalnej niezanieczyszczonej gleby ogrodowej w stosunku 1:1. Należy unikać kompostu, ponieważ może on zawierać toksyczne substancje chemiczne, na przykład metale ciężkie. Przed wykorzystaniem gleby należy z niej usunąć faunę (np. przez głębokie zamrażanie). Można zastosować także podłoże zawierające wyłącznie sztuczną glebę, jednak wówczas wskaźnik rozrodczości może być niższy niż wskaźnik uzyskiwany przy zastosowaniu mieszanego podłoża glebowego. Podłoże stosowane w hodowli powinno mieć pH 6,0 ± 0,5.

Hodowlę prowadzi się bez dostępu światła w temperaturze 15–20 °C ± 2 °C. Należy unikać temperatury wyższej niż 23 °C. Gleba powinna być wilgotna, lecz nie mokra. Odpowiednią zawartość wilgoci w glebie sprawdza się w następujący sposób: jeśli glebę delikatnie ściśnie się w dłoni, między palcami powinny pojawić się kropelki wody. Należy unikać warunków beztlenowych, dbając, aby pokrywy zbiorników z hodowlą umożliwiały odpowiednią wymianę gazową z atmosferą. Co tydzień glebę należy ostrożnie rozluźniać, aby ułatwić napowietrzanie.

Organizmy można karmić płatkami owsianymi. Płatki owsiane należy przechowywać w szczelnie zamykanych naczyniach, a przed użyciem należy je wysterylizować w autoklawie lub podgrzać, aby uniknąć infestacji roztoczy żerujących na pokarmach suchych (np. *Glyzyphagus sp.*, *Astigmata*, *Acarina*) lub roztoczy drapieżnych (np. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*). Po obróbce termicznej pokarm należy zemleć, aby łatwo było rozmieścić go na powierzchni gleby. Od czasu do czasu do płatków owsianych można dodać witaminy, mleko i olej z wątroby dorsza. Inne odpowiednie źródła pokarmu to drożdże piekarskie i pokarm dla ryb Tetramin.

Karmienie odbywa się w przybliżeniu dwa razy w tygodniu. Właściwą ilość płatków owsianych rozmieszcza się na powierzchni gleby lub ostrożnie miesza się z podłożem podczas rozluźniania gleby w celu ułatwienia napowietrzania. Bezwzględna ilość dostarczonego pokarmu zależy od liczby osobników w podłożu. Jako wskazówkę można przyjąć, że ilość pokarmu należy zwiększyć, jeżeli całość zostaje zjedzona w ciągu jednego dnia od podania. I odwrotnie, jeżeli pokarm wciąż pozostaje na powierzchni gdy nadchodzi pora drugiego karmienia (tydzień później), należy zredukować jego ilość. Pokarm, w którym rozwijają się grzyby, należy usunąć i wymienić. Po trzech miesiącach organizmy należy przenieść do świeżo przygotowanego podłoża.

Warunki hodowli uważa się za zadowalające, jeżeli organizmy: a) nie próbują opuścić podłoża glebowego; b) przekopują się szybko poprzez glebę, c) mają lśniącą zewnętrzną powłokę bez przyklejających się do niej cząstek gleby, d) mają mniej więcej białawą barwę, e) w hodowlach widoczne są organizmy w różnym wieku oraz f) rozmnażają się w sposób ciągły.

▼M6

Dodatek 5

Wykonanie badania z innymi gatunkami *Enchytraeus*

Wybór gatunków

Można wykorzystywać gatunki inne niż *E. albidus*, lecz należy odpowiednio dostosować procedurę badania i kryteria ważności. Ponieważ wiele gatunków *Enchytraeus* jest łatwo dostępnych i można je z powodzeniem utrzymać w laboratorium, najważniejszym kryterium wyboru gatunku innego niż *E. albidus* jest adekwatność ekologiczna i, dodatkowo, porównywalna wrażliwość. Mogą również istnieć formalne powody zmiany gatunku. Na przykład w krajach, gdzie *E. albidus* nie występuje i nie może być importowany (np. ze względu na ograniczenia związane z kwarantanną), konieczne jest wykorzystanie innego gatunku *Enchytraeus*.

Przykłady odpowiednich gatunków alternatywnych

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide i Graefe 1992): ostatnio gatunek ten często wykorzystuje się w badaniach ekotoksykologicznych z uwagi na łatwość jego hodowli i badania. Jest to jednak gatunek o małym rozmiarze, co utrudnia jego stosowanie w porównaniu z *E. albidus* (w szczególności na etapach poprzedzających zastosowanie metody barwienia). Nie ma pewności, czy gatunek *E. crypticus* żyje w terenie, jako że jego opisy dotyczą wyłącznie hodowli dżdżownic. Tym samym nieznane są jego wymagania ekologiczne.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): nazwa ta prawdopodobnie obejmuje grupę blisko spokrewnionych gatunków, które trudno jest odróżnić morfologicznie. Nie zaleca używać go w badaniach, dopóki nie można będzie zidentyfikować gatunku osobników użytych do badania. *E. buchholzi* występuje zwykle na łąkach i obszarach, w których struktura gleby została naruszona, takich jak pobocza dróg.

— *Enchytraeus luxuriosus*: gatunek ten był początkowo znany jako *E. „minutus”*, został on jednak ostatnio opisany (1). Po raz pierwszy został znaleziony przez U. Graefe'a (Hamburg) na łące niedaleko St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Niemcy). *E. luxuriosus* jest o około połowę mniejszy od *E. albidus*, lecz większy niż inne omówione tutaj gatunki, co sprawia, że mógłby stanowić dobrą alternatywę dla *E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen i Christensen 1963): występowanie tego gatunku zgłaszano do tej pory w glebach mineralnych w Niemczech i Hiszpanii, gdzie występuje on powszechnie, ale zwykle niezbyt licznie. W porównaniu z innymi małymi gatunkami tego rodzaju jest on również stosunkowo łatwy do zidentyfikowania. Nie wiadomo nic na temat jego zachowania w badaniach laboratoryjnych ani na temat jego wrażliwości na substancje chemiczne. Uznano go jednak za łatwy w hodowli (E. Belotti, informacje własne).

Warunki hodowli

Wszystkie wspomniane wyżej gatunki *Enchytraeus* można hodować w tych samych podłożach, które są stosowane do hodowli *E. albidus*. W związku z ich mniejszym rozmiarem naczynia do hodowli mogą być mniejsze i, choć można stosować ten sam pokarm, trzeba dostosować wielkość dawki. Cykl życia tych gatunków jest krótszy niż cykl życia *E. albidus*, a karmienie powinno odbywać się częściej.

Warunki badania

Warunki badania są zasadniczo takie same jak warunki obowiązujące w przypadku *E. albidus*, z tym że:

— rozmiar naczynia badawczego może (ale nie musi) być mniejszy;

— czas trwania badania rozrodczości może (ale nie musi) być krótszy, tj. może wynosić cztery tygodnie zamiast sześciu; czas trwania badania ustalającego zakres powinien pozostać bez zmian;

— ze względu na niewielki rozmiar młodych organizmów metoda barwienia jest zdecydowanie zalecana na potrzeby liczenia;

— kryterium ważności związane z „liczbą młodych osobników na naczynie badawcze w próbie kontrolnej” należy zmienić na „50”.

▼**M6**

BIBLIOGRAFIA

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

Dodatek 6

Szczegółowy opis technik ekstrakcji

Barwienie różem bengalskim

Metoda ta, początkowo opracowana w ekologii limnicznej (1), została zaproponowana po raz pierwszy jako metoda liczenia młodych wazonkowców przez W. de Coena (Uniwersytet w Gandawie, Belgia). Zmodyfikowana wersja (róż bengalski zmieszany z formaldehydem zamiast etanolu) została opracowana niezależnie przez RIVM w Bilthoven (2)(3).

Po zakończeniu ostatecznego badania (tj. po sześciu tygodniach) glebę z naczyń badawczych przenosi się do płytkiego pojemnika. Przydatne w tym celu jest naczynie Bellaplast lub kuweta fotograficzna z bruzdami w dnie; „bruzdy" są istotne, ponieważ ograniczają ruch organizmów w polu obserwacji. Młode osobniki utrwala się etanolem (około 5 ml na kontrpróbę). Następnie naczynia wypełnia się wodą do wysokości 1–2 cm. Dodaje się kilka kropel (200–300 ml) różu bengalskiego (1-procentowy roztwór w etanolu; alternatywą jest 0,5-procentowa eozyna) i dokładnie miesza się oba składniki. Po 12 godzinach organizmy powinny być zabarwione na czerwonawy kolor i powinny dać się łatwo policzyć, ponieważ będą leżały na powierzchni podłoża. Ewentualnie przed rozpoczęciem liczenia organizmów mieszaninę substratu i alkoholu można przemyć na sicie (wielkość oczek: 0,250 mm). Przy zastosowaniu tej procedury kalionit, torf i część piasku zostaną wypłukane, a organizmy zabarwione na czerwonawo będą bardziej widoczne i łatwiejsze do policzenia. Zastosowanie podświetlanych soczewek (wielkość soczewki co najmniej 100 × 75 mm ze współczynnikiem powiększenia 2–3x) również ułatwi liczenie.

Technika barwienia skraca czas liczenia do kilku minut na naczynie i zasadniczo jedna osoba powinna być w stanie ocenić wszystkie naczynia z jednego badania w ciągu maksymalnie dwóch dni.

Ekstrakcja na mokro

Ekstrakcję na mokro należy rozpocząć natychmiast po zakończeniu badania. Glebę z każdego naczynia badawczego umieszcza się w sitach z tworzywa sztucznego o oczkach około 1 mm. Sita zawiesza się następnie w miskach z tworzywa sztucznego tak, aby nie dotykały dna. Miski ostrożnie napełnia się wodą, do momentu aż próbki w sitach znajdą się całkowicie pod powierzchnią wody. Aby zapewnić współczynnik odzysku powyżej 90 % obecnych organizmów, należy zastosować okres ekstrakcji wynoszący 3 dni przy temperaturze 20 ± 2 °C. Na koniec okresu ekstrakcji sita usuwa się, a wodę (poza niewielką ilością) powoli się dekantuje, uważając, aby nie naruszyć osadu na dnie naczyń. Następnie miski z tworzywa sztucznego wstrząsa się lekko, aby uzyskać zawiesinę osadu w wodzie nadosadowej. Wodę przelewa się do szalki Petriego i, po osadzeniu się cząstek gleby, można zidentyfikować wazonkowce, usunąć je i policzyć, używając w tym celu mikroskopu stereoskopowego i delikatnej stalowej pęsety.

Flotacja

Metoda oparta na flotacji jest opisana w nocie sporządzonej przez R. Kupermana (4). Po utrwaleniu zawartości naczynia badawczego etanolem glebę zalewa się Ludoxem (AM-30 krzemionka koloidalna, 30 % wag. zawiesiny w wodzie) do poziomu 10–15 mm powyżej powierzchni gleby. Po dokładnym wymieszaniu gleby z odczynnikiem flotacyjnym przez 2–3 minuty można łatwo policzyć młode organizmy unoszące się na powierzchni.

BIBLIOGRAFIA

(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 Nr. 719102025. 46 s.

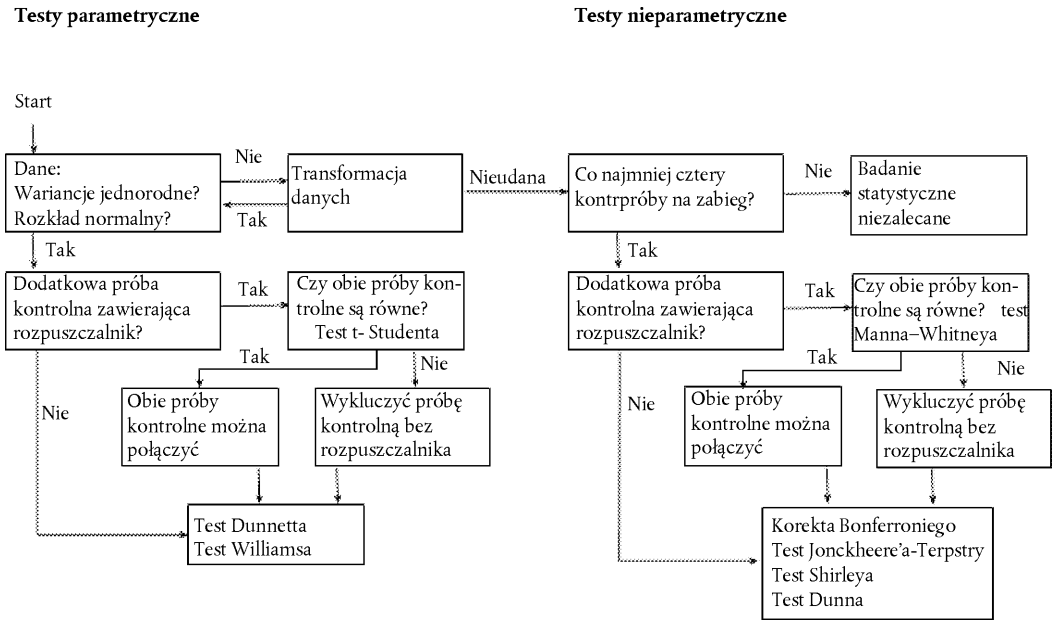
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. i Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108–121.

(4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. i Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. 19. roczne posiedzenie SETAC, Charlotte, Stany Zjednoczone. Zbiór abstraktów nr PMP069, s. 157.

▼**M6**

Dodatek 7

Przegląd statystycznej oceny danych (oznaczanie NOEC)



▼M6

C.33. BADANIE ROZRODCZOŚCI DŻDŻOWNIC (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 222 (2004). Opracowana została w celu oceny wpływu działania substancji chemicznych na zdolność rozrodczą (i inne subletalne punkty końcowe) gatunków *Eisenia fetida* (Savigny 1826) lub *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). Przeprowadzono badanie międzylaboratoryjne (3). Istnieje metoda badania ostrej toksyczności dla dżdżownic (4). Opublikowano szereg innych międzynarodowych i krajowych wytycznych dotyczących badań ostrej i chronicznej toksyczności dla dżdżownic (5)(6)(7)(8).

2. *Eisenia fetida / Eisenia andrei* są uważane za gatunki należące do przedstawicieli fauny żyjącej w glebie, w szczególności dżdżownic. Dostępne są podstawowe informacje dotyczące ekologii dżdżownic i ich zastosowania w badaniach ekotoskykologicznych (7)(9)(10)(11)(12).

ZASADA BADANIA

3. Osobniki dorosłe poddaje się narażeniu na zakres stężeń badanej substancji chemicznej, która jest wymieszana z glebą albo, w przypadku pestycydów, wprowadzona do gleby lub na glebę z wykorzystaniem procedur zgodnych z wzorcem stosowania substancji chemicznej. Metoda wprowadzenia zależy od celu badania. Zakres badanych stężeń wybiera się tak, aby wybrać stężenia, które prawdopodobnie mogą wywołać subletalne i letalne skutki w okresie ośmiu tygodni. Śmiertelność i wpływ na wzrost osobników dorosłych określa się po 4 tygodniach narażenia. Osobniki dorosłe usuwa się następnie z gleby, a wpływ na rozrodczość ocenia po kolejnych 4 tygodniach, licząc potomstwo obecne w glebie. Zdolność rozrodczą zwierząt narażonych na badaną substancję chemiczną porównuje się z próbami kontrolnymi w celu określenia (i) stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub (ii) EC_x (np. EC_{10}, EC_{50}), stosując model regresji w celu oszacowania stężenia, które spowoduje zmniejszenie zdolności rozrodczej o x %. Badane stężenia powinny zawierać w swoim zakresie EC_x (np. EC_{10}, EC_{50}), aby EC_x wynikało raczej z interpolacji niż ekstrapolacji (definicje znajdują się w dodatku 1).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

4. Dostęp do następujących informacji związanych z badaną substancją chemiczną powinien ułatwić opracowanie właściwych procedur badawczych:

   — rozpuszczalność w wodzie;

   — log K_{ow};

   — prężność pary;

   — i, w miarę możliwości, informacje na temat losów i zachowania w środowisku (np. wskaźniki fotolizy i hydrolizy, jeżeli są właściwe dla wzorców zastosowania).

5. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do wszystkich substancji chemicznych, niezależnie od ich rozpuszczalności w wodzie. Metoda badawcza nie ma zastosowania do lotnych substancji chemicznych, które definiuje się tutaj jako substancje, w odniesieniu do których stała Henry'ego lub współczynnik podziału powietrze-woda są większe niż jeden, lub do substancji chemicznych z prężnością pary powyżej 0,0133 Pa w temperaturze 25 °C.

6. W niniejszej metodzie badawczej nie uwzględnia się możliwej degradacji badanej substancji chemicznej podczas okresu badania. W związku z tym nie można zakładać, że w czasie trwania badania zostaną utrzymane początkowe wartości stężeń ekspozycyjnych. W tym przypadku zaleca się analizę chemiczną badanej substancji chemicznej na początku i na końcu badania.

▼M6

SUBSTANCJACHEMICZNA ODNIESIENIA

7. Należy określić EC_x lub NOEC substancji chemicznej odniesienia, aby zapewnić odpowiednie warunki badania w laboratorium i sprawdzić, czy reakcja organizmów użytych do badania nie zmieniła się w czasie. Wskazane jest badanie chemicznej substancji odniesienia co najmniej dwa razy do roku lub równolegle z określaniem toksyczności badanej substancji chemicznej, gdy badanie jest wykonywane z mniejszą częstotliwością. Karbendazym lub benomyl stanowią właściwe substancje chemiczne odniesienia, w przypadku których udowodniono wpływ na rozrodczość (3). Istotne skutki powinny być obserwowane między a) 1–5 mg substancji czynnej na kilogram suchej masy lub b) 250–500 g/ha lub 25–50 mg/m^2. Jeżeli badana seria obejmuje pozytywną normę toksyczną, stosuje się jedno stężenie i liczba kontrprób powinna być taka sama jak w przypadku prób kontrolnych.

WAŻNOŚĆ BADANIA

8. Aby wynik badania był ważny, powinny być spełnione następujące kryteria dotyczące prób kontrolnych:

— każda kontrpróba (zawierająca 10 osobników dorosłych) powinna wytworzyć ≥ 30 młodych osobników do zakończenia badania;

— współczynnik zmienności rozrodczości powinien wynosić ≤ 30 %;

— śmiertelność osobników dorosłych przez pierwsze 4 tygodnie badania powinna wynosić ≤ 10 %.

Jeżeli badanie nie spełni powyższych kryteriów ważności, należy je zakończyć, chyba że przedstawić można uzasadnienie kontynuacji badania. Uzasadnienie należy włączyć do sprawozdania.

OPIS BADANIA

Wyposażenie

9. Należy zastosować pojemniki badawcze wykonane ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału o pojemności około jednego do dwóch litrów. Naczynia te powinny mieć pole przekroju poprzecznego około 200 cm^2, aby umożliwić uzyskanie 5–6 cm głębokości wilgotnego podłoża, gdy sucha masa dodanego substratu wynosi 500–600 g. Konstrukcja pojemnika powinna umożliwiać wymianę gazową między podłożem i atmosferą oraz dostęp do światła (np. dzięki perforowanej przezroczystej osłonie), równocześnie zapobiegając ucieczce osobników. Jeżeli ilość podłoża użytego w badaniu jest znacznie większa niż 500–600 g na pojemnik badawczy, liczbę organizmów należy proporcjonalnie zwiększyć.

10. Wymagane jest standardowe wyposażenie laboratoryjne, w szczególności następujące urządzenia:

— suszarka szafkowa,

— mikroskop stereoskopowy,

— pehametr i fotometr,

— odpowiednie dokładne wagi,

— odpowiedni sprzęt do regulacji temperatury,

— odpowiedni sprzęt do regulacji wilgotności (nie jest konieczny, jeżeli naczynia narażone na działanie substancji mają pokrywki),

— inkubator lub małe pomieszczenie z regulacją temperatury,

— pincety, haczyki lub ezy,

— łaźnia wodna.

▼M6

Przygotowanie sztucznej gleby

11. W niniejszym badaniu zastosowano sztuczną glebę (5)(7) o następującym składzie (w oparciu o masy suche, suszone do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 oC):

— 10 % torfu sfagnowego (wartość pH możliwie najbardziej zbliżona do przedziału 5,5–6,0, bez widocznych pozostałości roślin, drobno zmielonego, osuszonego do zmierzonej wilgotności);

— 20 % glinki kaolinowej (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);

— 0,3–1,0 % węglanu wapnia ($CaCO_3$, sproszkowanego, do analiz), aby otrzymać wyjściowe pH 6,0 ± 0,5;

— 70 % kwarcowego piasku suszonego na powietrzu (w zależności od potrzebnej ilości $CaCO_3$), głównie drobnego piasku, w którym ponad 50 % cząstek ma wymiary 50–200 mikronów.

Uwaga 1: Ilość potrzebnego $CaCO_3$ będzie zależna od składników podłoża glebowego, w tym pokarmu, i należy ją oznaczyć, dokonując bezpośrednio przed badaniem pomiaru pH podpróbek gleby. pH mierzy się w zmieszanej próbce 1-molowego roztworu chlorku potasu (KCl) lub 0,01-molowego roztworu chlorku wapnia ($CaCl_2$) (13).

Uwaga 2: Zawartość węgla organicznego w sztucznej glebie można zredukować, np. zmniejszając zawartość torfu do 4–5 % i odpowiednio zwiększając zawartość piasku. Dzięki takiemu zmniejszeniu zawartości węgla organicznego mogą zmniejszyć się możliwości adsorpcji badanej substancji chemicznej do gleby (węgiel organiczny), a dostępność badanej substancji chemicznej dla organizmów może wzrosnąć. Wykazano, że gatunek Eisenia fetida może spełniać kryteria ważności dotyczące rozrodczości, jeśli bada się go w glebach naturalnych o niższej zawartości węgla organicznego (np. 2,7 %) (14); istnieją także doświadczenia pokazujące, że pozwala na to również zastosowanie sztucznej gleby przy zawartości torfu na poziomie 5 %. Dlatego też przed zastosowaniem takiej gleby w badaniu ostatecznym nie ma konieczności wykazania, że sztuczna gleba może umożliwić spełnienie kryteriów ważności badania, pod warunkiem że zawartość torfu nie zostanie zmniejszona poniżej poziomu określonego powyżej.

Uwaga 3: W przypadku zastosowania gleby naturalnej w dodatkowych badaniach (np. wyższego rzędu) należy również określić przydatność gleby i stosowność w odniesieniu do spełnienia kryteriów ważności.

12. Suche składniki gleby dokładnie miesza się (np. w dużym mieszalniku laboratoryjnym) w dobrze wentylowanym pomieszczeniu. Przed rozpoczęciem badania suchą sztuczną glebę nawilża się wstępnie, dodając odpowiednią ilość wody dejonizowanej w celu uzyskania około połowy końcowej zawartości wody, stanowiącej 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby (co odpowiada suchej masie o wilgotności 50 ± 10 %). W rezultacie powstanie podłoże, które nie zawiera wody stojącej ani niezwiązanej wody w przypadku ściśnięcia w dłoni. Maksymalną pojemność wodną sztucznej gleby określa się zgodnie z procedurami określonymi w dodatku 2, normie ISO 11274 (15) albo równoważnej normie UE.

13. Jeżeli badaną substancję chemiczną stosuje się na powierzchni gleby lub miesza się z glebą bez wody, ostateczną ilość wody można wmieszać do sztucznej gleby podczas przygotowania gleby. Jeżeli badaną substancję chemiczną miesza się z glebą z pewną ilością wody, dodatkową wodę można dodać wraz z badaną substancją chemiczną (zob. pkt 19).

14. Zawartość wilgoci w glebie oznacza się na początku i na końcu badania, zgodnie z normą ISO 11465 (16) lub równoważną normą UE, zaś pH gleby określa się zgodnie z dodatkiem 3 lub normą ISO 10390 (13) lub równoważną normą UE. Oznaczenia te należy przeprowadzać w próbce gleby

▼M6

kontrolnej i próbce każdej gleby z badanym stężeniem. Nie należy korygować pH gleby podczas badania kwasowych substancji chemicznych lub podstawowych chemikaliów. Podczas badania należy monitorować zawartość wilgoci, co jakiś czas ważąc pojemniki (zob. pkt 26 i 30).

Wybór i przygotowanie zwierząt użytych do badania

15. Gatunkiem wykorzystywanym w badaniu jest *Eisenia fetida* lub *Eisenia andrei* (1)(2). Do rozpoczęcia badania potrzebne są osobniki dorosłe w wieku od dwóch miesięcy do roku, posiadające siodełko. Organizmy należy wybrać z zsynchronizowanej hodowli o stosunkowo jednorodnej strukturze wiekowej (dodatek 4). Różnice wieku między osobnikami w badanej grupie nie powinny przekraczać 4 tygodni.

16. Wybrane organizmy należy aklimatyzować przez co najmniej jeden dzień w sztucznym podłożu glebowym, które ma być zastosowane w badaniu. W tym czasie organizmy należy karmić tym samym pokarmem, który zostanie zastosowany w badaniu (zob. pkt 31–33).

17. Należy oddzielnie ważyć grupy 10 organizmów, przypisując grupy losowo do pojemników badawczych na początku badania. Przed zważeniem osobniki wyjęte z gleby należy przemyć (wodą dejonizowaną) i nadmiar wody usunąć, umieszczając osobniki na chwilę na bibule filtracyjnej. Mokra masa pojedynczych organizmów powinna wynosić 250–600 mg.

Przygotowywanie badanych stężeń

18. Można zastosować dwie metody podania badanej substancji chemicznej: wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą (zob. pkt 19–21) albo nałożenie na powierzchnię gleby (zob. pkt 22–24). Wybór odpowiedniej metody zależy od celu badania. Zwykle zaleca się wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą. Mogą być jednak wymagane procedury stosowania, które są zgodne ze zwykłą praktyką rolniczą (np. opryskiwanie płynną postacią lub zastosowanie specjalnych postaci pestycydów, takich jak granulki lub zaprawy do nasion). Rozpuszczalniki zastosowane w celu ułatwienia podania badanej substancji chemicznej do gleby należy wybrać na podstawie ich niskiej toksyczności dla dżdżownic; w projekcie badania należy przewidzieć odpowiednią próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem (zob. pkt 27).

Wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą

Badana substancja chemiczna rozpuszczalna w wodzie

19. Roztwór badanej substancji chemicznej przygotowuje się bezpośrednio przed rozpoczęciem badania w wodzie dejonizowanej w ilości wystarczającej do wszystkich kontrprób w ramach jednego stężenia. Aby ułatwić przygotowanie roztworu do badań, wymagane może być zastosowanie rozpuszczalnika obojętnego. Wygodnie jest przygotować ilość roztworu niezbędną do osiągnięcia ostatecznej zawartości wilgoci (40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby). Roztwór miesza się dokładnie z podłożem glebowym przed wprowadzeniem go do pojemnika badawczego.

Badana substancja chemiczna nierozpuszczalna w wodzie

20. Badaną substancję chemiczną rozpuszcza się w niewielkiej ilości odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego (np. acetonu), a następnie rozpryskuje na niewielkiej ilości piasku kwarcowego albo miesza z tym piaskiem. Rozpuszczalnik usuwa się potem, odparowując go przez co najmniej kilka minut pod okapem wyciągowym. Przygotowany piasek miesza się następnie dokładnie ze wstępnie nawilżoną sztuczną glebą. Następnie dodaje się wodę dejonizowaną (w wymaganej ilości), aby osiągnąć ostateczną zawartość wilgoci na poziomie 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby, i miesza się ją z glebą. Tak przygotowaną glebę można przełożyć do pojemników badawczych. Należy zachować ostrożność, ponieważ niektóre rozpuszczalniki mogą być toksyczne dla dżdżownic.

▼M6

Badana substancja chemiczna nierozpuszczalna w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych

21. Przygotowuje się mieszaninę zawierającą 10 g drobno zmielonego przemysłowego piasku kwarcowego i taką ilość badanej substancji chemicznej, jaka jest konieczna do osiągnięcia badanego stężenia w glebie. Otrzymaną mieszaninę miesza się następnie dokładnie ze wstępnie nawilżoną sztuczną glebą. Następnie dodaje się wodę dejonizowaną w ilości wymaganej do tego, by osiągnąć ostateczną zawartość wilgoci na poziomie 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby, i miesza się ją z glebą. Tak przygotowaną glebę można przełożyć do pojemników badawczych.

Zastosowanie badanej substancji chemicznej na powierzchni gleby

22. Glebę poddaje się działaniu substancji chemicznej po wprowadzeniu do gleby organizmów. Najpierw napełnia się pojemniki badawcze nawilżonym podłożem glebowym, a następnie umieszcza się na powierzchni podłoża zważone organizmy. Zdrowe organizmy zwykle natychmiast zakopują się w podłożu, w związku z czym organizmy, które zostaną na powierzchni po 15 minutach, uznaje się za uszkodzone i należy je wymienić. W przypadku wymiany organizmy nowe i organizmy wymieniane należy zważyć, tak aby była znana całkowita masa w relacji pełnej grupy organizmów narażonych na działanie substancji oraz całkowita waga pojemnika z organizmami na początku badania.

23. Podaje się badaną substancję chemiczną. Nie należy dodawać jej do gleby w ciągu pół godziny od wprowadzenia do niej organizmów (lub jeżeli organizmy znajdują się na powierzchni gleby), aby uniknąć bezpośredniego narażenia na badaną substancję chemiczną przez kontakt ze skórą. Jeżeli substancja chemiczna jest pestycydem, właściwe może być zastosowanie jej na powierzchni gleby przez rozpylenie. Badaną substancję chemiczną należy rozprowadzić na powierzchni gleby jak najrównomierniej, korzystając z odpowiednich laboratoryjnych urządzeń rozpylających symulujących opryski w terenie. Przed zastosowaniem badanej substancji chemicznej należy zdjąć pokrywę pojemnika badawczego i zastąpić ją wkładką, która ochroni ścianki boczne pojemnika przed opryskaniem. Wkładkę można wykonać z pojemnika badawczego, z którego usunięto dno. Substancję należy podać w temperaturze 20 ± 2 °C, a w przypadku roztworów wodnych, emulsji lub zawiesin dawka podawanej wody powinna wynosić 600–800 ml/m^2. Dawkę należy zweryfikować za pomocą odpowiedniej techniki kalibracji. Szczególne postacie, takie jak granulki lub zaprawy do nasion, należy stosować w sposób zgodny z praktyką rolniczą.

24. Pojemniki badawcze należy pozostawić bez przykrycia na jedną godzinę, aby umożliwić odparowanie lotnego rozpuszczalnika związanego z zastosowaniem badanej substancji chemicznej. Należy uważać, aby żaden organizm nie uciekł w tym czasie z naczynia badawczego.

PROCEDURA

Grupy badane i kontrolne

25. Zaleca się wprowadzenie 10 organizmów na 500–600 g suchej masy sztucznej gleby (tj. 50–60 g gleby na organizm). Jeżeli stosuje się większe ilości gleby, co może mieć miejsce podczas badania pestycydów o szczególnych trybach zastosowania, takich jak zaprawy do nasion, należy utrzymać zawartość 50–60 g gleby na organizm, zwiększając liczbę organizmów. Na każdy pojemnik z próbą kontrolną i próbą poddaną zabiegowi przygotowuje się po dziesięć organizmów. Organizmy przemywa się wodą i wyciera, a następnie umieszcza się je na chłonnym papierze na krótki czas, aby umożliwić wyschnięcie nadmiaru wody.

26. Aby zapobiec systematycznym błędom w rozmieszczaniu organizmów w pojemnikach badawczych, należy określić jednorodność badanej populacji przez osobne zważenie 20 organizmów pobranych losowo z populacji, z której pobrane zostaną organizmy badane. Po zapewnieniu jednorodności

▼M6

należy wybrać partie organizmów, zważyć je i przyporządkować do pojemników badawczych, stosując procedurę randomizacji. Po dodaniu organizmów badanych należy określić masę każdego pojemnika badawczego, aby ustalić wagę początkową, którą można wykorzystać jako podstawę monitorowania zawartości wilgoci w glebie podczas trwania badania, jak opisano w pkt 30. Pojemniki badawcze następnie przykrywa się zgodnie z opisem w pkt 9 i umieszcza w komorze badawczej.

27. W przypadku każdej z metod wprowadzenia badanej substancji chemicznej opisanych w pkt 18–24 przygotowuje się odpowiednie próby kontrolne. Podczas przygotowywania prób kontrolnych postępuje się zgodnie z odpowiednimi opisanymi procedurami, z tym, że nie dodaje się badanej substancji chemicznej. W związku z tym, w stosownych przypadkach w próbach kontrolnych stosuje się rozpuszczalniki organiczne, piasek kwarcowy lub inne nośniki, w stężeniach/ilościach odpowiednich do tych, które zastosowano podczas zabiegów. W przypadku gdy do dodania badanej substancji chemicznej wykorzystuje się rozpuszczalnik lub inny nośnik, należy również przygotować dodatkową próbę kontrolną bez nośnika lub badanej substancji chemicznej i zbadać ją w celu upewnienia się, że nośnik nie ma wpływu na wynik.

Warunki badania

28. Badanie przeprowadza się w temperaturze 20 ± 2 °C. Badanie przeprowadza się w warunkach kontrolowanych cykli światło–ciemność (najlepiej 16 godzin światła i 8 godzin bez dostępu światła) z natężeniem światła na obszarze, w którym znajdują się pojemniki badawcze, na poziomie 400–800 luksów.

29. Pojemników badawczych nie napowietrza się podczas badania, jednak konstrukcja pokryw naczyń badawczych powinna umożliwiać wymianę gazową, a jednocześnie ograniczać parowanie wilgoci (zob. pkt 9).

30. Zawartość wody w podłożu glebowym w pojemnikach badawczych utrzymywana jest podczas trwania badania przez ponowne ważenie pojemników badawczych (odejmując ich pokrywy) co jakiś czas. W razie potrzeby straty uzupełnia się wodą dejonizowaną. Zawartość wody nie powinna różnić się od zawartości wody na początku badania o więcej niż 10 %.

Karmienie

31. Każdy pokarm, którego jakość okazała się odpowiednia co najmniej do utrzymania masy organizmów podczas badania uważa się za dopuszczalny. Doświadczenie pokazuje, że odpowiednim pokarmem jest mąka owsiana lub obornik krowi lub koński. Należy kontrolować, czy krowom lub koniom, od których pozyskiwany jest obornik, nie podaje się leków ani substancji chemicznych, takich jak stymulatory wzrostu, nematocydy, lub podobnych produktów weterynaryjnych, które mogłyby negatywnie wpłynąć na organizmy w trakcie badania. Zaleca się samodzielnie zbierany obornik krowi, ponieważ doświadczenie pokazało, że obornik krowi dostępny na rynku jako nawóz ogrodowy może mieć niekorzystny wpływ na organizmy. Obornik powinien być suszony powietrzem, drobno zmielony i pasteryzowany przed użyciem.

32. Każda świeżą partię pokarmu należy podać hodowli organizmów niepoddanej badaniu zanim zostanie użyta w badaniu, aby mieć pewność, że jej jakość jest odpowiednia. Wzrost i wytwarzanie kokonów nie powinny być zmniejszone w porównaniu do organizmów trzymanych w podłożu, które nie zawiera nowej partii pokarmu (warunki opisane w metodzie badawczej C.8(4)).

33. Pokarm podaje się po raz pierwszy jeden dzień po dodaniu organizmów i zastosowaniu badanej substancji chemicznej w glebie. Na powierzchni gleby w każdym zbiorniku rozprowadza się około 5 g pokarmu, a następnie nawilża się go wodą dejonizowaną (około 5–6 ml na zbiornik). Następnie

▼M6

pokarm podaje się raz na tydzień podczas 4-tygodniowego okresu badania. Jeżeli pokarm pozostanie niezjedzony, dawkę należy zmniejszyć, aby zapobiec rozwojowi grzybów lub pleśnieniu. Osobniki dorosłe usuwa się z gleby w 28. dniu badania. Następnie podaje się kolejne 5 g pokarmu do każdego pojemnika badawczego. Podczas pozostałych 4 tygodni badania nie następuje już karmienie.

Dobór badanych stężeń

34. W doborze odpowiednich badanych stężeń pomocna powinna być uprzednia znajomość toksyczności badanej substancji chemicznej np. z badania ostrej toksyczności (4) lub z badań ustalających zakres. W stosownych przypadkach przeprowadza się badanie ustalające zakres, stosując np. pięć badanych stężeń wynoszących 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg (suchej masy gleby). Jedna kontrpróba dla każdej grupy badanej i kontrolnej jest wystarczająca. Badanie ustalające zakres trwa dwa tygodnie i po jego zakończeniu ocenia się śmiertelność.

Projekt doświadczenia

35. Ponieważ nie jest możliwe wskazanie jednego sumarycznego wskaźnika dla tego badania, w niniejszej metodzie badawczej przewiduje się wyznaczanie NOEC i EC_x. NOEC będzie najprawdopodobniej wymagane przez organy regulacyjne w przewidywanej przyszłości. W niedalekiej przyszłości stosowanie EC_x może stać się powszechniejsze ze względów statystycznych i ekologicznych. Dlatego też proponowane są trzy układy w oparciu o zalecenia wynikające z badania międzylaboratoryjnego w ramach metody badawczej dotyczącej rozmnażania wazonkowcowatych (17)

36. Przy ustalaniu zakresu stężeń należy wziąć pod uwagę, co następuje:

— w celu wyznaczenia NOEC należy zbadać co najmniej pięć/dwanaście stężeń uporządkowanych w szereg geometryczny. Zaleca się cztery kontrpróby dla każdego badanego stężenia i dodatkowo osiem prób kontrolnych. Kolejne stężenie nie powinno być większe niż 2,0-krotność poprzedniego;

— w celu wyznaczenia ECx (np. EC10, EC50) zaleca się stosowanie odpowiedniej liczby stężeń, tak aby uzyskać co najmniej cztery statystycznie istotnie różne średnie reakcje przy tych stężeniach. Zaleca się co najmniej dwie kontrpróby dla każdego badanego stężenia oraz sześć kontrprób kontrolnych. Współczynnik rozstawienia stężeń może być zróżnicowany, tj. może być równy lub mniejszy niż 1,8 w oczekiwanym przedziale skutków oraz może przekraczać 1,8 przy wyższych i niższych stężeniach;

— połączone podejście umożliwia wyznaczenie zarówno NOEC, jak i ECx. Należy zastosować osiem badanych stężeń uporządkowanych w szeregu geometrycznym. Zaleca się cztery kontrpróby dla każdego zabiegu i dodatkowo osiem prób kontrolnych. Kolejne stężenie nie powinno być większe niż 1,8-krotność poprzedniego;

Czas trwania badania i pomiary

37. W 28. dniu żyjące osobniki dorosłe poddaje się obserwacji i liczy. Odnotowuje się również wszelkie nietypowe zachowania (np. niezdolność zakopywania się w glebie; leżenie w bezruchu) oraz zmiany w morfologii (np. otwarte rany). Następnie wszystkie osobniki dorosłe usuwa się z naczyń badawczych oraz liczy i waży. Przeniesienie gleby zawierającej organizmy na czystą tacę przed oceną może ułatwić poszukiwanie osobników dorosłych. Przed zważeniem osobniki wyjęte z gleby należy przemyć (wodą dejonizowaną) i nadmiar wody usunąć, umieszczając osobniki na chwilę na bibule filtracyjnej. Osobniki, których nie znaleziono na tym etapie, odnotowuje się jako martwe, ponieważ zakłada się, że osobniki takie padły i rozłożyły się przed oceną.

▼M6

38. Jeżeli z pojemników wyjęto glebę, należy ją następnie z powrotem włożyć do pojemników (bez osobników dorosłych, ale z ewentualnymi kokonami, które mogły zostać wytworzone). Następnie glebę inkubuje się przez dodatkowe cztery tygodnie w tych samych warunkach badania, z tym, że karmienie odbywa się dopiero po rozpoczęciu tej fazy badania (zob. pkt 33).

39. Po upływie drugiego 4-tygodniowego okresu ustala się liczbę młodych, które wykluły się z kokonów w glebie służącej do badania, oraz liczbę kokonów z zastosowaniem procedur opisanych w dodatku 5. W całym okresie badania należy również odnotowywać wszelkie oznaki uszkodzeń osobników.

Badanie graniczne

40. Jeżeli w badaniu ustalającym zakres nie zaobserwowano żadnych efektów przy najwyższym stężeniu (tj. 1 000 mg/kg), jako badanie graniczne można przeprowadzić badanie rozrodczości, stosując badane stężenie wynoszące 1 000 mg/kg. Badanie graniczne zapewni możliwość wykazania, że NOEC w przypadku rozrodczości jest wyższe niż stężenie graniczne, przy czym do badania używa się minimalnej liczby osobników. Należy zastosować osiem kontrprób zarówno w odniesieniu do gleby podanej zabiegowi, jak i próby kontrolnej.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

41. Oprócz przeglądu zamieszczonego w dodatku 6 w ramach niniejszej metody badawczej nie podaje się żadnych definitywnych wytycznych statystycznych na potrzeby analizy wyników badania.

42. Jednym z punktów końcowych jest śmiertelność. Należy jednak odnotować również wszelkie zmiany w zachowaniu (np. niezdolność zakopywania się w glebie; leżenie w bezruchu przy szklanej ściance naczynia badawczego) i w morfologii (np. otwarte rany) osobników dorosłych, jak również ewentualne występowanie młodych. W celu wyznaczenia LC_{50} zwykle stosuje się analizę probitową (18) albo regresję logistyczną. Niemniej w przypadkach, w których ta metoda analizy jest nieodpowiednia (np. jeśli dostępne są mniej niż trzy stężenia, które doprowadziły do częściowej śmiertelności), można zastosować alternatywne metody. Wspomniane metody mogą obejmować średnie kroczące (19), uproszczoną metodę Spearmana-Kärbera (20) albo prostą interpolację (np. średnia geometryczna LC_0 i LC_{100}, obliczona jako pierwiastek kwadratowy LC_0 pomnożony przez LC_{100}).

43. Innym punktem końcowym jest płodność (tj. liczba wyklutych młodych). Podobnie jak w przypadku badania ustalającego zakres wszystkie pozostałe objawy szkodliwości należy jednak również odnotować w sprawozdaniu końcowym. Do celów analizy statystycznej dotyczącej rozrodczości wymagane jest obliczenie średniej arytmetycznej $\bar{x}$ oraz odchylenia standardowego w odniesieniu do grupy badanej i grupy kontrolnej.

44. Jeżeli przeprowadzono analizę wariancji, odchylenie standardowe (s) i stopnie swobody (df) można zastąpić połączonym oszacowaniem wariancji uzyskanym z analizy wariancji i jego stopniem swobody odpowiednio, pod warunkiem że wariancja nie jest uzależniona od stężenia. W takim przypadku należy zastosować pojedyncze wariancje grupy kontrolnej i grup badanych. Wartości te oblicza się zwykle za pomocą dostępnego na rynku oprogramowania statystycznego, stosując wyniki uzyskane w odniesieniu do naczynia jako kontrpróby. Jeżeli zasadne wydaje się łączenie danych na potrzeby prób kontrolnych negatywnych i prób kontrolnych z rozpuszczalnikiem zamiast badania pod kątem jednej z nich, należy zbadać te dane, aby sprawdzić, czy nie są one wyraźnie odmienne (w celu ustalenia odpowiedniego badania należy zapoznać się z pkt 47 i dodatkiem 6).

45. Dalsze badanie i wnioskowanie statystyczne jest uzależnione od tego, czy wartości kontrpróby są normalnie rozłożone i jednorodne w odniesieniu do ich wariancji.

▼M6

Oszacowanie NOEC

46. Preferowane powinno być stosowanie silnych testów. Należy korzystać z informacji np. wynikających z wcześniejszych doświadczeń z badaniami międzylaboratoryjnymi lub z innych danych historycznych dotyczących tego, czy dane są w przybliżeniu normalnie rozłożone. Istotniejsza jest jednorodność wariancji (homoskedastyczność). Jak pokazuje doświadczenie, wariancja często wzrasta wraz z rosnącą średnią. W takich przypadkach transformacja danych może doprowadzić do homoskedastyczności. Transformacja taka powinna się jednak raczej opierać na doświadczeniu związanym z historycznymi danymi niż na danych będących przedmiotem analizy. W przypadku danych jednorodnych należy przeprowadzić wielokrotne testy t-Studenta, takie jak test Williamsa (α = 0,05, jednostronny) (21)(22) albo w niektórych przypadkach test Dunnetta (23)(24). Należy zaznaczyć, że w przypadku nierównej replikacji wartości (t) z tabeli trzeba skorygować, jak sugerują Dunnett i Williams. Niekiedy ze względu na dużą wariancję reakcje nie wzrastają/zmniejszają się regularnie. W takim przypadku dużego odchylenia od monotoniczności bardziej odpowiedni jest test Dunnetta. Jeżeli występują odchylenia od homoskedastyczności, zasadne może być dokładniejsze zbadanie możliwego wpływu na wariancje w celu ustalenia, czy można zastosować testy t-Studenta bez zbytniej utraty mocy statystycznej (25). Ewentualnie można zastosować wielokrotny test Manna-Whitneya, np. test Manna-Whitneya z korektą Bonferroniego według Holma (26), albo test nieparametryczny [np. test Jonckheere'a (27)(28) lub Shirleya (29) (30)] w przypadku gdy dane te przejawiają heteroskedastyczność, ale poza tym są spójne z podstawową monotoniczną zależnością dawka-odpowiedź, i zasadniczo testy te są preferowane w stosunku do testów t-Studenta dla nierównych wariancji (zob. również schemat w dodatku 6).

47. Jeżeli przeprowadzono badanie graniczne i warunki wstępne dotyczące parametrycznych procedur testów (normalność, jednorodność) są spełnione, można zastosować test t-Studenta w parach albo procedurę testu Manna-Whitneya (31).

Oszacowanie EC_x

48. W celu obliczenia dowolnej wartości EC_x po uzyskaniu odpowiedniej funkcji dawka-odpowiedź wykorzystuje się średnie z poszczególnych zabiegów do analizy regresji (liniowej albo nieliniowej). W odniesieniu do wzrostu osobników jako reakcji ciągłej wartości EC_x można oszacować, stosując odpowiednią analizę regresji (32). Wśród odpowiednich funkcji dla danych binarnych (śmiertelność/przeżycie) oraz liczby potomstwa znajdują się normalne funkcje: sigmoidalna, logistyczna lub Weibulla, zawierające dwa do czterech parametrów, z których część może również modelować reakcje hormetyczne. Jeżeli funkcję dawka-odpowiedź dopasowano za pomocą analizy regresji liniowej, przed oszacowaniem EC_x należy ustalić wysokie r^2 (współczynnik determinacji) lub nachylenie za pomocą analizy regresji, wstawiając wartość odpowiadającą x % średniej wartości próby kontrolnej do równania otrzymanego w wyniku analizy regresji. Granice ufności na poziomie 95 % oblicza się zgodnie z metodą Fiellera (przytoczoną przez Finneya (18)) lub innymi odpowiednimi współczesnymi metodami.

49. Ewentualnie reakcję modeluje się jako odsetek lub proporcję modelowego parametru, który interpretuje się jako średnią reakcję próby kontrolnej. W takich przypadkach normalną krzywą sigmoidalną (logistyczną, Weibulla) można często z łatwością dopasować do wyników, wykorzystując procedurę regresji probitowej (18). W takich przypadkach funkcję wagi trzeba dostosować na potrzeby odpowiedzi metrycznych, jak podaje Christensen (33). Jeżeli jednak zaobserwowano hormezę, analizę probitową należy zastąpić czteroparametrową funkcją logistyczną lub Weibulla, dopasowaną za pomocą procedury regresji nieliniowej (34). Jeżeli dopasowanie odpowiedniej funkcji dawka-odpowiedź do danych nie jest możliwe, wówczas do oszacowania EC_x i jego granic ufności można zastosować alternatywne metody, takie jak średnie kroczące za Thompsonem (19) i uproszczona procedura Spearmana-Kärbera (20).

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

50. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje.

▼M6

Badana substancja chemiczna:

— szczegółowy opis badanej substancji chemicznej, partia, seria i numer CAS, stopień czystości;

— właściwości badanej substancji chemicznej (np. log Kow, rozpuszczalność w wodzie, prężność pary, stała Henry'ego (H) i informacje o losach i zachowaniu się).

Organizmy użyte do badania:

— zwierzęta użyte do badania: gatunek, nazwa systematyczna, źródło organizmów i warunki hodowli;

— wiek, przedział wielkości (masy) organizmów użytych do badania.

Warunki badania

— szczegóły przygotowania gleby do badania;

— maksymalna pojemność wodna gleby;

— opis techniki stosowanej do wprowadzenia badanej substancji chemicznej do gleby;

— szczegółowe dane dotyczące pomocniczych substancji chemicznych użytych w celu podania badanej substancji chemicznej;

— w stosownych przypadkach szczegółowe dane dotyczące kalibracji urządzenia rozpylającego;

— opis projektu doświadczenia i procedury;

— wielkość pojemników badawczych oraz objętość gleby do badań;

— natężenie światła, czas trwania cykli światło–brak światła, temperatura;

— opis schematu żywienia, rodzaj i ilość pokarmu używanego w badaniu, terminy karmienia;

— pH i zawartość wody w glebie na początku i na końcu badania.

Wyniki badania:

— śmiertelność osobników dorosłych (%) w każdym pojemniku badawczym po zakończeniu pierwszych 4 tygodni badania;

— całkowita masa osobników dorosłych na początku badania w każdym pojemniku badawczym;

— zmiany masy ciała żywych osobników dorosłych (% masy wyjściowej) w każdym pojemniku badawczym po pierwszych czterech tygodniach badania;

— liczba osobników młodych wyklutych w każdym pojemniku badawczym na końcu badania;

— opis wyraźnych symptomów fizjologicznych lub patologicznych lub widocznych zmian w zachowaniu;

— wyniki otrzymane z wykorzystaniem badanej substancji chemicznej odniesienia;

— wartości LC_{50}, NOEC lub EC_x (np. EC_{50}, EC_{10}) w odniesieniu do rozrodczości, jeżeli niektóre z nich mają zastosowanie z przedziałami ufności oraz wykres dopasowanego modelu użyty do ich obliczenia, wszystkie informacje i obserwacje pomocne w interpretacji wyników;

— wykres zależności dawka-odpowiedź;

— wyniki mające zastosowanie do każdego pojemnika badawczego.

Odchylenia od procedur opisanych w niniejszej metodzie badawczej oraz wszelkie nietypowe zdarzenia, jakie miały miejsce podczas badania.

BIBLIOGRAFIA

(1) Jaenicke, J. (1982). *Eisenia foetida* is two biological species. Megadrilogica 4, 6–8.

(2) Oien, N. i J. Stenerson (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. W: 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, s. 50–82.

(4) Rozdział C.8 niniejszego załącznika. Dżdżownica, badanie toksyczności ostrej.

(5) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, nr 11268-2. ISO, Genewa.

(6) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Genewa.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., i L. Posthuma, (red.). SETAC Press, 456 s.

(8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (US EPA). Urząd ds. Zapobiegania, Pestycydów i Substancji Toksycznych. EPA712-C-96-167, kwiecień 1996 r.

(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. Raport EUR 8714 EN, Komisja Wspólnot Europejskich.

(11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards i F. Heimbach (red.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C.A. i J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, wydanie 3. Chapman and Hall, Londyn.

(13) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1994). Soil Quality – Determination of pH, nr 10390. ISO, Genewa.

(14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. i Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. W: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden S., Erb R., Dott W. i Eisentraeger A. (red.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59–81.

(15) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1992). Soil Quality – Determination of water retention characteristics – Laboratory methods, nr 11274. ISO, Genewa.

(16) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1993). Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, nr 11465. ISO, Genewa.

(17) Römbke, J. i Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 s.

▼**M6**

(18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (wydanie 3.), s. 19–76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, Londyn.

(20) Hamilton M.A., R.C. Russo i R.V. Thurston. (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 F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. Wydanie 2. W.H. Freeman and Company. Nowy Jork.

(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 J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25–32.

▼M6

Dodatek 1

Definicje

Następujące definicje mają zastosowanie do niniejszej metody badawczej.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

EC_x (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływu na organizmy użyte do badania w danym okresie narażenia, w porównaniu z próbą kontrolną. Na przykład EC_{50} jest stężeniem, które w przybliżeniu ma wpływ na punkt końcowy badania w 50 % narażonej populacji w określonym okresie narażenia. W niniejszym badaniu wszystkie stężenia efektywne wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby lub jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na jednostkę powierzchni gleby.

LC_0 (stężenie niepowodujące skutków śmiertelnych) to stężenie badanej substancji chemicznej, które nie prowadzi do śmierci żadnego z organizmów użytych do badania, narażonych na działanie tej substancji przez określony czas. W niniejszym badaniu LC_0 wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby.

LC_{50} (mediana stężenia śmiertelnego) to stężenie badanej substancji chemicznej, które prowadzi do śmierci 50 % organizmów użytych do badania narażonych na działanie tej substancji przez określony czas. W niniejszym badaniu LC_{50} wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby lub jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na jednostkę powierzchni gleby.

LC_{100} (stężenie całkowicie śmiertelne) to stężenie badanej substancji chemicznej, które prowadzi do śmierci 100 % organizmów użytych do badania, narażonych na działanie tej substancji przez określony czas. W niniejszym badaniu LC_{100} wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby.

LOEC (najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany) oznacza najniższe stężenie badanej substancji chemicznej mające statystycznie istotny skutek ($p < 0,05$). W niniejszym badaniu LOEC wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby lub jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na jednostkę powierzchni gleby. Wszystkie badane stężenia wyższe niż LOEC powinny normalnie wykazywać skutek, który różni się statystycznie od próby kontrolnej. Wszelkie odchylenia od powyższego muszą zostać uzasadnione w sprawozdaniu z badania.

NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian) oznacza najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej bezpośrednio poniżej LOEC, przy którym nie obserwuje się żadnych zmian. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające NOEC nie ma statystycznie istotnego skutku ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia, jeżeli porówna się je z próbą kontrolną.

Wskaźnik rozrodczości oznacza średnią liczbę młodych organizmów na określoną liczbę osobników dorosłych w czasie trwania badania.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M6

Dodatek 2

Określenie maksymalnej pojemności wodnej gleby

Jak wykazano, do określania maksymalnej pojemności wodnej gleby (WHC) odpowiednia jest następująca metoda. Została ona opisana w załączniku C do normy ISO DIS 11268-2 (1).

Pobrać do badania określoną ilość (np. 5 g) gleby z podłoża za pomocą odpowiedniego przyrządu (wybieraka ślimakowego itp.). Przykryć dno wybieraka kawałkiem bibuły filtracyjnej, a następnie, po napełnieniu wodą, umieść wybierak na stelażu w łaźni wodnej. Wybierak należy stopniowo zanurzać aż do momentu, gdy poziom wody znajdzie się powyżej powierzchni gleby. Następnie należy zostawić go w wodzie na około trzy godziny. Ponieważ nie cała woda wchłonięta przez kapilary w glebie może zostać zatrzymana, należy umieścić wybierak na podłożu z wilgotnego drobno zmielonego piasku kwarcowego umieszczonego w przykrytym naczyniu (aby zapobiec wysychaniu) na dwie godziny w celu odsączenia próbki gleby. Próbkę należy następnie zważyć, wysuszyć do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C. Pojemność wodną gleby (WHC) można następnie obliczyć w następujący sposób:

$$\text{WHC (w \% suchej masy)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

gdzie:

S = podłoże nasycone wodą + masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej

T = tara (masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej)

D = sucha masa podłoża

BIBLIOGRAFIA:

1) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, nr 11268-2. ISO, Genewa.

▼**M6**

Dodatek 3

Określenie pH gleby

Podana poniżej metoda określania pH gleby opiera się na opisie zawartym w normie ISO DIS 10390: Jakość gleby – Oznaczanie pH (1).

Określoną ilość gleby suszy się w temperaturze pokojowej przez co najmniej 12 godzin. Następnie sporządzana jest zawiesina gleby (zawierająca co najmniej 5 gramów gleby) w 1-molowym roztworze chlorku potasu czystym do analizy (KCl) lub 0,01-molowym roztworze chlorku wapnia czystym do analizy (CaCl2) o objętości pięciokrotnie większej od objętości gleby. Otrzymaną zawiesinę dokładnie wymieszać, wstrząsając przez pięć minut, a następnie odstawić do osadzenia się na co najmniej 2 godziny, ale nie na dłużej niż 24 godziny. W fazie ciekłej pH jest mierzone za pomocą pehametru, który jest kalibrowany przed każdym pomiarem przy użyciu odpowiedniego szeregu roztworów buforowych (np. pH 4,0 i 7,0).

BIBLIOGRAFIA:

1) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1994). Soil Quality – Determination of pH, nr 10390. ISO, Genewa.

▼M6

Dodatek 4

Hodowla Eisenia fetida/Eisenia andrei

Zaleca się prowadzenie hodowli w komorze klimatycznej w 20 °C ± 2 °C. W tej temperaturze i przy zapewnieniu wystarczającej ilości pokarmu organizmy dojrzeją po około 2–3 miesiącach.

Obydwa gatunki można hodować w różnych odchodach zwierzęcych. Zalecaną pożywką hodowlaną jest mieszanina obornika końskiego lub krowiego oraz torfu w stosunku 50:50. Należy kontrolować, czy krowom lub koniom, od których pozyskiwany jest obornik, nie podaje się leków ani substancji chemicznych, takich jak stymulatory wzrostu, nematocydy, lub podobnych produktów weterynaryjnych, które mogłyby negatywnie wpłynąć na organizmy w trakcie badania. Zaleca się stosowanie samodzielnie zebranego obornika pozyskanego z „organicznego" źródła, ponieważ, jak wynika z doświadczenia, dostępny na rynku obornik stosowany jako nawóz ogrodniczy może wywierać niekorzystny wpływ na organizmy. Taka pożywka powinna mieć wartość pH w przybliżeniu 6–7 (regulowane węglanem wapnia), niskie przewodnictwo jonowe (niższe niż 6 mS/cm lub 0,5 % stężenia soli) oraz nie powinna być zbyt zanieczyszczona amoniakiem lub zwierzęcym moczem. Podłoże powinno być wilgotne, ale nie nazbyt mokre. Do hodowli odpowiednie są skrzynki hodowlane o pojemności 10–50 litrów.

Aby uzyskać organizmy o standardowym wieku i standardowej wielkości (masie), hodowlę najlepiej rozpocząć z zastosowaniem kokonów. Po utworzeniu hodowli utrzymuje się ją, umieszczając osobniki dorosłe w skrzynce hodowlanej ze świeżym podłożem na 14–28 dni, aby umożliwić wytworzenie kolejnych kokonów. Następnie osobniki dorosłe usuwa się, a młode wyklute z kokonów wykorzystuje się jako podstawę do kolejnej hodowli. Organizmy nieustannie karmi się odchodami zwierzęcymi i co jakiś czas przenosi do świeżego podłoża. Doświadczenie pokazuje, że odpowiednim pokarmem jest suszony na powietrzu i drobno zmielony obornik krowi lub koński lub mąka owsiana. Należy upewnić się, czy krowom lub koniom, od których pozyskiwany jest obornik, nie podaje się substancji chemicznych, takich jak stymulatory wzrostu, które mogłyby negatywnie wpłynąć na organizmy w trakcie długoterminowej hodowli. Organizmy wyklute z kokonów wykorzystuje się do badania, gdy osiągną wiek 2–12 miesięcy i są uznawane za osobniki dorosłe.

Organizmy można uznać za zdrowe, jeśli przekopują się przez podłoże, nie próbują opuścić podłoża oraz rozmnażają się w sposób ciągły. Jeżeli dżdżownice poruszają się bardzo wolno i mają żółty tylny koniec ciała, wskazuje to na zużycie podłoża. W takim przypadku zaleca się podanie świeżego podłoża lub zmniejszenie gęstości obsady.

▼M6

Dodatek 5

Techniki liczenia młodych osobników wyklutych z kokonów

Ręczne sortowanie organizmów wyjętych z gleby jest bardzo czasochłonne. Dlatego też zalecane są dwie alternatywne metody:

a) pojemniki badawcze umieszcza się w łaźni wodnej najpierw w temperaturze 40 °C, którą następnie zwiększa się do 60 °C. Po około 20 minutach młode osobniki powinny pojawić się na powierzchni gleby, skąd można je z łatwością wyjąć i policzyć;

b) badaną glebę można przepłukać na sicie, stosując metodę opracowaną przez van Gestela i in. (1), pod warunkiem że torf i obornik lub mąka owsiana dodane do gleby były zmielone na drobny proszek. Dwa sita (o średnicy 30 cm) o otworach wielkości 0,5 mm umieszcza się jedno na drugim. Zawartość pojemnika badawczego przemywa się na sitach mocnym strumieniem wody wodociągowej, w wyniku czego młode osobniki i kokony zatrzymują się głównie na górnym sicie. Należy pamiętać, że cała powierzchnia górnego sita powinna być wilgotna podczas tej operacji, tak aby młode unosiły się na warstwie wody, dzięki czemu nie będą wypełzały przez otwory sita. Najlepsze rezultaty uzyskuje się przy użyciu natrysku prysznicowego.

Po przemyciu całego podłoża glebowego na sicie młode osobniki i kokony można spłukać z górnego sita do miski. Następnie zawartość odstawia się na chwilę, aby puste kokony wypłynęły na powierzchnię wody, a wypełnione kokony i młode organizmy opadły na dno. Stojącą wodę można następnie zlać, a młode i kokony przełożyć na szalkę Petriego zawierającą odrobinę wody. Organizmy można wyjąć w celu przeliczenia za pomocą igły lub pęsety.

Doświadczenie pokazuje, że metoda a) jest bardziej odpowiednia do ekstrakcji młodych organizmów, które można przemywać na sicie nawet o otworach 0,5 mm.

Zawsze należy jednak ustalić skuteczność metody zastosowanej do usunięcia organizmów (i w miarę potrzeby kokonów) z podłoża glebowego. W przypadku zastosowania techniki ręcznego sortowania zaleca się przeprowadzenie tej czynności dwukrotnie na wszystkich próbach.

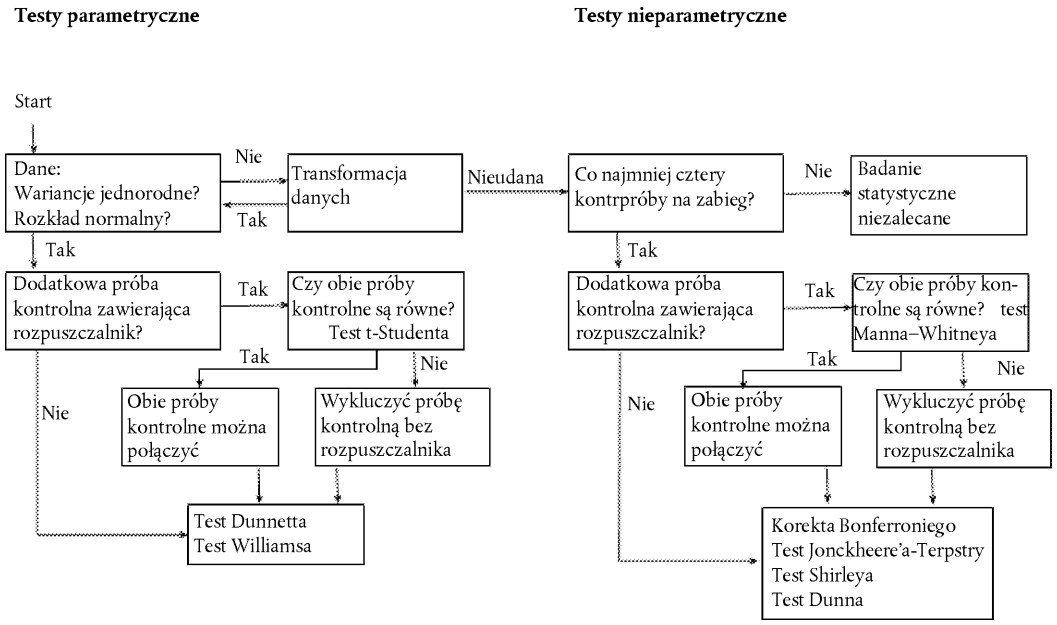
BIBLIOGRAFIA:

(1) Van Gestel, C.A.M., 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

Dodatek 6

Przegląd statystycznej oceny danych (oznaczanie NOEC)



▼M6

C.34. OKREŚLENIE ZAHAMOWANIA AKTYWNOŚCI BAKTERII BEZTLENOWYCH – OGRANICZENIE WYTWARZANIA GAZU Z BEZTLENOWO FERMENTUJĄCYCH OSADÓW (ŚCIEKOWYCH)

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 224 (2007). Substancje chemiczne odprowadzane do środowiska wodnego przechodzą przez obszary tlenowe i beztlenowe, w których mogą ulec rozkładowi lub mogą zahamować aktywność bakterii; w niektórych przypadkach mogą pozostać nienaruszone w obszarach beztlenowych przez dziesięciolecia lub dłużej. Na pierwszym etapie procesu oczyszczania ścieków, tj. na etapie osadzania wstępnego, zachodzą procesy tlenowe w supernatancie i procesy beztlenowe w osadzie pod supernatantem. Na kolejnym etapie zachodzą procesy tlenowe w komorze napowietrzania osadu czynnego oraz procesy beztlenowe w osadzie pod supernatantem w osadniku wtórnym. Osad z obu etapów poddaje się zwykle obróbce beztlenowej, w wyniku czego powstaje metan i dwutlenek węgla, które z reguły wykorzystuje się do wytwarzania energii elektrycznej. W środowisku naturalnym substancje chemiczne docierające do osadów w zatokach, ujściach rzek i morzu najczęściej pozostają w tych strefach beztlenowych na zawsze, jeśli nie ulegną biodegradacji. Większe ilości niektórych substancji chemicznych zapewne dotrą do tych obszarów ze względu na ich właściwości fizyczne, takie jak niska rozpuszczalność w wodzie, wysoka adsorpcja w zawiesinie, jak również niezdolność do biodegradacji w warunkach tlenowych.

2. Chociaż pożądane jest, aby substancje chemiczne uwalniane do środowiska ulegały biodegradacji zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, zasadnicze znaczenie ma to, aby takie substancje chemiczne nie hamowały aktywności mikroorganizmów w żadnej ze stref. W Zjednoczonym Królestwie wystąpiło kilka przypadków całkowitego zahamowania produkcji metanu spowodowanego na przykład obecnością pentachlorofenolu w odprowadzanych ściekach przemysłowych, czego skutkiem był bardzo kosztowny wywóz takiego osadu z komór fermentacyjnych w „bezpieczne” miejsca oraz przywóz zdrowych osadów fermentujących z sąsiednich instalacji. Miało jednak miejsce wiele przypadków mniej poważnego zakłócenia fermentacji przez szereg innych substancji chemicznych, w tym fluorowęglowodory alifatyczne (czyszczenie chemiczne) i detergenty, co doprowadziło do poważnego osłabienia efektywności komory fermentacyjnej.

3. Zahamowania aktywności bakterii (oddychania osadu czynnego) dotyczy tylko jedna metoda badawcza C.11 (1), w ramach której ocenia się wpływ badanych substancji chemicznych na poziom poboru tlenu w obecności podłoża. Metoda ta jest powszechnie stosowana w celu wczesnego ostrzegania przed możliwym szkodliwym wpływem substancji chemicznych na obróbkę tlenową ścieków, jak również w celu wskazania niehamujących stężeń badanych substancji chemicznych, które mają być stosowane w różnych badaniach pod kątem biodegradowalności. Metoda badawcza C.43 (2) daje ograniczoną możliwość określenia toksyczności badanej substancji chemicznej dla wytwarzania gazu przez osad beztlenowy, rozcieńczony do jednej dziesiątej normalnej zawartości substancji stałych, tak aby umożliwić wystarczająco precyzyjną ocenę odsetka biodegradacji. Ponieważ rozcieńczony osad może być bardziej wrażliwy na hamujące substancje chemiczne, grupa ISO podjęła decyzję o opracowaniu metody badania z wykorzystaniem osadu nierozcieńczonego. Przeanalizowano co najmniej trzy projekty (z Danii, Niemiec i Zjednoczonego Królestwa) i ostatecznie opracowano dwie normy ISO – jedną z wykorzystaniem osadu nierozcieńczonego, ISO 13641-1 (3), i drugą z wykorzystaniem osadu rozcieńczonego w stosunku 1:100, ISO 13641-2 (4), tak aby uwzględnić szlam i osady o niskiej populacji bakterii. Obydwie metody poddano badaniu międzylaboratoryjnemu (5); część 1 potwierdzono jako akceptowalną normę, natomiast zdania na temat części 2 były podzielone. Zjednoczone Królestwo stwierdziło, że ponieważ znaczna część uczestników zgłosiła bardzo niski poziom lub brak wytwarzania gazu, po części ze względu na zbyt wysoki procent powierzchni gazowej (75 %), aby zapewnić optymalną czułość, metoda wymaga przeprowadzenia dalszych analiz.

4. We wcześniejszych pracach prowadzonych w Zjednoczonym Królestwie (6)(7) opisywano metodę manometryczną z wykorzystaniem nierozcieńczonego osadu fermentującego oraz surowego osadu ściekowego jako podłoża w kolbach o pojemności 500 ml; aparatura ta była nieporęczna, a fetor surowego osadu był odrażający. Bardziej kompaktowe i wygodne urządzenie

▼M6

Sheltona i Tiedje (8) opracowane przez Battersby'ego i Wilsona (9) zostało jakiś czas później zastosowane z powodzeniem przez Wilsona i in. (10). Kawahara i in. (11) z powodzeniem przygotowali bardziej standardowe osady w laboratorium do celów wykorzystania w badaniach różnych substancji chemicznych pod kątem biodegradowalności i zahamowania w warunkach beztlenowych. Co więcej, do celów badania surowy osad jako podłoże zastąpiono osadem beztlenowym rozcieńczonym w stosunku 1:100 albo szlamem, osadami itp. o niskiej aktywności bakterii.

5. Przedmiotowa metoda może dostarczyć informacji, które są przydatne w przewidywaniu ewentualnego wpływu badanej substancji chemicznej na wytwarzanie gazu w beztlenowych komorach fermentacyjnych. Niemniej wyłącznie dłuższe badania w większym stopniu symulujące pracę komór fermentacyjnych mogą wskazać, czy może nastąpić adaptacja mikroorganizmów do badanej substancji chemicznej czy też substancje chemiczne, w przypadku których prawdopodobna jest absorpcja i adsorpcja w osadzie, mogą w miarę upływu czasu wytworzyć stężenie toksyczne wyższe niż dozwolone w danym badaniu.

ZASADA BADANIA

6. Podwielokrotności mieszaniny beztlenowo fermentującego osadu (od 20 g/l do 40 g/l łącznej zawartości części stałych) i degradowalnego roztworu podłoża są inkubowane oddzielnie i równocześnie z różnymi stężeniami badanej substancji chemicznej w zamkniętych naczyniach przez okres do 3 dni. Ilość wyprodukowanego gazu (metanu i dwutlenku węgla) mierzy się wzrostem ciśnienia (Pa) w butlach. Procent zahamowania wytwarzania gazu spowodowanego różnymi stężeniami badanej substancji chemicznej oblicza się na postawie ilości wytworzonych w poszczególnych butlach badanych i kontrolnych. EC_{50} i inne stężenia efektywne oblicza się na podstawie wykresów procentu zahamowania w stosunku do stężenia badanych substancji chemicznych albo, częściej, za pomocą jego logarytmu.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

7. Badane substancje chemiczne powinny być zwykle stosowane w najczystszej łatwo dostępnej postaci, ponieważ zanieczyszczenia występujące w niektórych substancjach chemicznych, np. chlorofenole, mogą być o wiele bardziej toksyczne niż sama badana substancja chemiczna. Należy jednak rozważyć konieczność zbadania substancji chemicznych w postaci, w jakiej są one produkowane / udostępniane na rynku. Nie zaleca się rutynowego stosowania produktu w postaci użytkowej, niemniej w przypadku słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych właściwe może być zastosowanie takiego materiału. Właściwości badanej substancji chemicznej, które powinny być znane to: rozpuszczalność w wodzie i niektórych rozpuszczalnikach organicznych, prężność pary, współczynnik adsorpcji, hydroliza i biodegradowalność w warunkach beztlenowych.

ZAKRES STOSOWANIA METODY

8. Badanie ma zastosowanie do substancji chemicznych, które są rozpuszczalne albo nierozpuszczalne w wodzie, z uwzględnieniem lotnych substancji chemicznych. Należy jednak zachować szczególną uwagę w przypadku materiałów o niskiej rozpuszczalności w wodzie (zob. bibliografia pozycja (12)) oraz o dużej lotności. Można również wykorzystać inokula z innych obszarów beztlenowych, np. szlam, gleby nasycone czy osady. Beztlenowe systemy bakteryjne, które uprzednio były narażone na toksyczne substancje chemiczne, można zaadaptować, tak aby utrzymać ich aktywność w obecności ksenobiotycznych substancji chemicznych. Inokula z zaadaptowanych systemów bakteryjnych mogą wykazywać wyższą tolerancję na badane substancje chemiczne w porównaniu z inokulami uzyskanymi z niezaadaptowanych systemów.

SUBSTANCJE CHEMICZNE ODNIESIENIA

9. W celu sprawdzenia procedury bada się chemiczną substancję odniesienia, ustawiając odpowiednie naczynia równolegle w ramach zwykłych rund badania; wykazano, że 3,5-dichlorofenol jest stałym inhibitorem beztlenowego wytwarzania gazu, jak również zużycia tlenu przez osad czynny i inne reakcje biochemiczne. Jak wykazano, dwie pozostałe substancje chemiczne, tj. metyleno-bis(tiocyjanian) i pentachlorofenol, mają większy wpływ hamujący na produkcję metanu niż 3,5-dichlorofenol, niemniej wyniki z udziałem tych substancji nie zostały potwierdzone. Pentachlorofenol nie jest zalecany ze względu na fakt, że nie jest łatwo dostępny w czystej postaci.

▼M6

ODTWARZALNOŚĆ WYNIKÓW

10. W międzynarodowym badaniu międzylaboratoryjnym (5) odnotowano jedynie zadowalającą odtwarzalność w wartościach EC_{50} wśród 10 uczestniczących laboratoriów dla 3,5-dichlorofenolu i kwasu 2-bromoetano-sulfonowego. (Zakres dla pierwszego wynosił od 32 mg/l do 502 mg/l, zaś dla drugiego – 220–2 190 mg/l.)

Liczba laboratoriów	W mg/l			W mg/g osadu		
	średnia	odchylenie standardowe	cv(%)	średnia	odchylenie standardowe	cv(%)
	3,5-dichlorofenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	kwas 2-bromoetano-sulfonowy					
10	1 058	896	85	34	26	76

Wartości EC_{50} uzyskane w badaniu międzylaboratoryjnym – nierozcieńczony osad.

11. Wysokie współczynniki zmienności między poszczególnymi laboratoriami w dużym zakresie odzwierciedlają różnice we wrażliwości mikroorganizmów osadowych wynikające z ich wcześniejszego narażenia na badaną substancję chemiczną lub inną substancję o zbliżonym składzie chemicznym lub z braku takiego narażenia. Wartość EC_{50} określono na podstawie stężenia osadu z dokładnością niewiele większą niż wartość „objętościową" (mg/l). Trzy laboratoria, które zanotowały dokładne wartości EC_{50} dla 3,5-dichlorofenolu, wykazały współczynniki zmienności (odpowiednio 22 %, 9 %, i 18 % dla EC_{50} mg/g) znacznie niższe niż średnia tych współczynników dla wszystkich dziesięciu laboratoriów. Poszczególne średnie dla tych trzech laboratoriów wynosiły odpowiednio 3,1, 3,2 i 2,8 mg/g. Niższe dopuszczalne współczynniki zmienności między laboratoriami porównane ze znacznie wyższymi współczynnikami między wartościami laboratoryjnymi, mianowicie 9–22 % por. 92 %, wskazują na występowanie znacznych różnic we właściwościach poszczególnych osadów.

OPIS METODY

Aparatura

12. Wymagany jest zwykły sprzęt laboratoryjny i następujące przyrządy:

a) inkubator – iskrobezpieczny, z regulacją temperatury 35 C ± 2 C;

b) ciśnieniowe szklane naczynia badawcze o odpowiednich wymiarach nominalnych ([1]), każde wyposażone w gazoszczelną septę, która może wytrzymać ciśnienie około 2 barów lub 2×10^5 Pa (jako powłoki użyć np. PTFE = politetrafluoroetylenu). Szklane butelki do surowicy o pojemności nominalnej 125 ml i pojemności rzeczywistej około 160 ml, zamknięte szczelnymi septami ([2]) i obciskanymi pierścieniami aluminiowymi; z powodzeniem można stosować też butelki o całkowitej pojemności wynoszącej 0,1–1 l;

([1]) Zalecana pojemność to 0,1–1 l.

([2]) Zaleca się stosowanie gazoszczelnych sept silikonowych. Zaleca się również przetestowanie gazoszczelności sept, w szczególności butylowych sept kauczukowych, ponieważ niektóre septy dostępne w handlu nie są wystarczająco gazoszczelne w przypadku metanu, a niektóre nie zachowują szczelności, kiedy przekłuje się je igłą w warunkach badania.

— Zaleca się stosowanie powlekanych sept gazoszczelnych, a w przypadku lotnych substancji chemicznych istnieje obowiązek stosowania takich sept (niektóre dostępne w handlu septy są stosunkowo cienkie, ich grubość wynosi mniej niż 0,5 cm i nie zachowują gazoszczelności po przekłuciu igłą strzykawki);

— zaleca się stosowanie butylowych sept kauczukowych (około 1 cm), w przypadku gdy substancje badane nie są substancjami lotnymi (septy te zachowują zwykle gazoszczelność po przekłuciu);

— przed przetestowaniem zaleca się dokładne zbadanie sept pod kątem ich gazoszczelności po przekłuciu.

▼M6

c) precyzyjny ciśnieniomierz [1] i połączenie z igłą;

całkowite wytwarzanie gazu (metanu i dwutlenku węgla) mierzone za pomocą ciśnieniomierza przystosowanego do mierzenia i uwalniania wytworzonego gazu; przykładem takiego odpowiedniego urządzenia jest ręczny precyzyjny ciśnieniomierz podłączony do igły strzykawki; gazoszczelny zawór trójdrogowy ułatwia obniżenie nadmiernego ciśnienia (dodatek 1). Wewnętrzna objętość przewodów przetwornika ciśnienia i zaworu powinna być jak najmniejsza, aby błędy wynikające z pominięcia objętości aparatury były niewielkie;

d) izolowane pojemniki wykorzystywane do transportowania osadu fermentującego;

e) trójdrogowe zawory ciśnieniowe;

f) sito o kwadratowych oczkach wielkości 1 mm;

g) zbiornik do fermentowania osadu – szklana lub wykonana z polietylenu o wysokiej gęstości butelka o pojemności około 5 litrów wyposażona w mieszadło i urządzenia umożliwiające przepuszczanie strumienia azotu (zob. pkt 13) przez fazę nadpowierzchniową;

h) filtry membranowe (0,2 μm) przeznaczone do sterylizacji podłoża;

i) mikrostrzykawki służące do gazoszczelnego połączenia przetwornika ciśnienia (zob. pkt 12 lit. c)) z fazą nadpowierzchniową w butelkach (zob. pkt 12 lit. b)), a także do dodawania nierozpuszczalnych ciekłych materiałów badanych do butelek;

j) komora rękawicowa, opcjonalnie, ale zalecana, w której utrzymywane jest niewielkie nadciśnienie azotu.

Odczynniki

13. W całym badaniu należy stosować odczynniki czyste do analizy. W całym badaniu należy stosować wysokiej czystości azot z zawartością tlenu nieprzekraczającą 5 μl/l.

Woda

14. Jeżeli na jakimkolwiek etapie badania wymagane jest rozcieńczenie, należy zastosować wodę dejonizowaną, która została wcześniej odpowietrzona. Nie ma potrzeby sporządzania analitycznych prób kontrolnych tej wody, ale należy zapewnić regularny przegląd aparatury służącej do dejonizacji. Stosować wodę dejonizowaną także do przygotowywania roztworu podstawowego. Przed dodaniem inokulum beztlenowego do jakiegokolwiek roztworu lub przed rozcieńczeniem badanego materiału upewnić się, że roztwór i badany materiał są odtlenione. Można to zrobić, przepuszczając przez wodę rozcieńczającą (lub rozcieńczenia) azot przez 1 godzinę przed dodaniem inokulum, lub alternatywnie, podgrzewając wodę rozcieńczającą do punktu wrzenia i schładzając ją do temperatury pokojowej w atmosferze beztlenowej.

Przefermentowany osad

15. Aktywnie fermentujący osad pobrać z komory fermentacyjnej oczyszczalni ścieków lub z laboratoryjnej komory fermentacyjnej, w której oczyszczane są głównie ścieki domowe. Informacje praktyczne dotyczące osadu pochodzącego z laboratoryjnej komory fermentacyjnej można znaleźć w pozycji bibliograficznej (11). Jeżeli przewiduje się zastosowanie zaadaptowanego

[1] Ciśnieniomierz należy stosować i kalibrować w regularnych odstępach czasu zgodnie z instrukcją producenta. W przypadku zastosowania ciśnieniomierza o zalecanej jakości, np. wyposażonego w stalową membranę, niepotrzebna jest kalibracja w laboratorium. Kalibrację ciśnieniomierza powinna przeprowadzać licencjonowana instytucja w zalecanych odstępach czasu. Dokładność kalibracji można sprawdzić w laboratorium za pomocą jednopunktowego pomiaru pod ciśnieniem 1×10^5 Pa z wykorzystaniem ciśnieniomierza z odczytem mechanicznym. Jeżeli ciśnienie w tym punkcie zostanie zmierzone poprawnie, liniowość również pozostanie niezmieniona. Jeżeli stosuje się inne urządzenia pomiarowe (bez kalibracji certyfikowanej przez producenta), konwersję zaleca się przeprowadzać w całkowitym zakresie w regularnych odstępach czasu (dodatek 2).

▼M6

inokulum, można brać pod uwagę zastosowanie fermentującego osadu z oczyszczalni ścieków przemysłowych. Do pobierania osadu używać butelek z szeroką szyjką, wykonanych z polietylenu o wysokiej gęstości lub podobnego materiału, który może się rozszerzać. Napełnić butelki do pobierania próbek osadem do wysokości około 1 cm od wylotu butelki i szczelnie zamknąć, najlepiej używając do tego celu zaworu bezpieczeństwa (pkt 12 lit. e)), a następnie w celu zminimalizowania szoku termicznego umieścić w izolowanych pojemnikach (pkt 12 lit. d)) do momentu przeniesienia ich do inkubatora, którego temperaturę utrzymuje się na poziomie 35 °C ± 2 °C. Otwierając butelki, należy pamiętać o obniżeniu nadmiernego ciśnienia gazu przez ostrożne rozszczelnienie korka lub za pomocą trójdrogowego zaworu ciśnieniowego (pkt 12 lit. e)). Zaleca się wykorzystanie osadu w ciągu kilku godzin od pobrania, w przeciwnym wypadku należy przechowywać go w temperaturze 35 °C ± 2 °C w fazie nadopwierzchniowej azotu, jednak nie dłużej niż przez 3 dni, gdyż w takim okresie występuje zwykle niewielka utrata aktywności.

Uwaga – Fermentujący osad wytwarza łatwopalne gazy, które powodują ryzyko pożaru i wybuchu: zawiera również potencjalnie patogenne organizmy, dlatego mając do czynienia z osadem, należy zachować właściwe środki ostrożności. Ze względów bezpieczeństwa do pobierania osadu nie stosować szklanych naczyń.

Inokulum

16. Bezpośrednio przed zastosowaniem należy połączyć osad, delikatnie mieszając go i przepuszczając przez sito o oczkach wielkości 1 mm^2 (pkt 12 lit. f)) do odpowiedniej butelki (pkt 12 lit. g)) przez której fazę nadpowierzchniową przechodzi strumień azotu. Odłożyć próbkę do pomiaru stężenia całkowitej zawartości substancji stałych (zob. np. norma ISO 11923 (13) lub równoważna norma UE). Zasadniczo stosować osad bez jego rozcieńczania. Stężenie części stałych wynosi zwykle 2–4 % (stężenie masowe). Sprawdzić wartość pH osadu i w razie potrzeby skorygować do 7 ± 0,5.

Podłoże użyte w badaniu

17. W 100 ml wody dejonizowanej rozpuścić 10 g pożywki bulionowej (np. Oxoid), 10 g wyciągu z drożdży i 10 g D-glukozy. Wysterylizować, filtrując na filtrze membranowym 0,2 μm (pkt 12 lit. h)), i natychmiast zastosować lub przechowywać w temperaturze 4 °C nie dłużej niż 1 dzień.

Badana substancja chemiczna

18. Przygotować oddzielny roztwór podstawowy dla każdej rozpuszczalnej w wodzie badanej substancji chemicznej, tak aby zawierał na przykład 10 g/l substancji chemicznej w odtlenionej wodzie rozcieńczającej (pkt 14). Stosować odpowiednie objętości tych roztworów podstawowych w celu przegotowania mieszanin reakcyjnych zawierających progresywne stężenia. Alternatywnie przygotować serię rozcieńczeń każdego roztworu podstawowego, tak aby objętość dodana do butelek badawczych była taka sama dla każdego wymaganego stężenia końcowego. W razie potrzeby skorygować pH roztworów podstawowych do 7 ± 0,2.

19. W przypadku badanych substancji chemicznych, które są niewystarczająco rozpuszczalne w wodzie, sprawdzić w normie ISO 10634 (12) lub równoważnej normie UE. Jeżeli wymagane jest zastosowanie rozpuszczalnika organicznego, unikać rozpuszczalników takich jak chloroform lub tetrachlorek węgla, o których wiadomo, że znacząco hamują wytwarzanie metanu. Przygotować roztwór o odpowiednim stężeniu, składający się z nierozpuszczalnej w wodzie substancji chemicznej rozpuszczonej we właściwym rozpuszczalniku lotnym, na przykład acetonie, eterze dietylowym. Dodać wymaganą objętość roztworu z rozpuszczalnikiem do pustych butelek badawczych (pkt 12 lit. b)) i odparować rozpuszczalnik przed dodaniem osadu. W odniesieniu do innych zabiegów stosować normę ISO 10634 (12) lub równoważną normę UE, jednak należy pamiętać o tym, że wszelkie środki powierzchniowo czynne wykorzystywane do produkcji emulsji mogą być inhibitorem beztlenowego wytwarzania gazu. Jeżeli uznaje się, że obecność rozpuszczalników organicznych i środków emulgujących powoduje powstanie artefaktów, badaną substancję chemiczną można dodać bezpośrednio do badanej mieszaniny w postaci substancji w proszku lub cieczy. Lotne substancje chemiczne i nierozpuszczalne w wodzie ciekłe badane substancje chemiczne można wstrzyknąć do butelek do surowicy zawierających inokulum, używając mikrostrzykawek (pkt 12 lit. i)).

▼M6

20. Dodać badane substancje chemiczne do butelek w celu uzyskania geometrycznego ciągu stężeń, na przykład, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l i 15,6 mg/l. Jeżeli na podstawie podobnych substancji chemicznych nie można określić zakresu toksyczności, w celu określenia odpowiedniego zakresu należy najpierw przeprowadzić wstępne badanie ustalające zakres przy wykorzystaniu stężeń 1 000 mg/l, 100 mg/l i 10 mg/l.

Substancja chemiczna odniesienia

21. Przygotować roztwór wodny 3,5-dichlorofenolu (10 g/l), stopniowo dodając minimalną ilość roztworu wodorotlenku sodu, wynoszącą 5 mol/l, do substancji stałej i jednocześnie mieszając powstający roztwór do momentu jego rozpuszczenia. Następnie dodać odtlenioną wodę rozcieńczającą (pkt 14) do wymaganej objętości; sonikacja może wspomóc proces rozpuszczania. Inne substancje chemiczne odniesienia można stosować w przypadku uzyskania średniego zakresu EC_{50} w co najmniej trzech badaniach wykorzystujących różne inokula (inne źródła lub inne czasy pobrania inokulów).

INTERFERENCJA/BŁĘDY

22. Niektóre składniki osadu mogłyby przypuszczalnie reagować z potencjalnymi inhibitorami enzymatycznymi, sprawiając, że będą one niedostępne dla mikroorganizmów, a przez to skutkując niskim zahamowaniem lub jego brakiem. Również w przypadku gdy osad zawiera już substancję chemiczną będącą inhibitorem enzymatycznym, uzyskano by błędny wynik, gdyby tę substancją chemiczną poddano badaniu. Oprócz tych możliwości istnieje szereg zidentyfikowanych czynników, które mogą prowadzić do błędnych wyników. Czynniki te wymieniono w dodatku 3 wraz z metodami eliminowania lub przynajmniej ograniczania błędów.

PROCEDURA BADANIA

23. Liczba koniecznych kontrprób zależy od stopnia dokładności wymaganego w odniesieniu do wskaźników zahamowania. W przypadku gdy korki butelek są wystarczająco gazoszczelne przez cały okres badania, stosować tylko jedną partię (obejmującą co najmniej trzy naczynia) butelek badawczych w odniesieniu do każdego wymaganego stężenia. Podobnie stosować jedną partię butelek z substancją chemiczną odniesienia i jeden zbiór prób kontrolnych. Jeżeli korki butelek nadają się tylko do jednorazowego przekłucia lub niewielkiej liczby przekłuć, zastosować partię (np. obejmującą trzy naczynia) butelek badawczych w odniesieniu do każdego odstępu czasowego (t), dla którego wymagane są wyniki dotyczące wszystkich stężeń badanej substancji chemicznej, które mają zostać zbadane. Podobnie zastosować „t” partii butelek w odniesieniu do substancji chemicznej odniesienia i w odniesieniu do prób kontrolnych.

24. Zaleca się wykorzystanie komory rękawicowej (pkt 12 lit. j)). Co najmniej 30 minut przed rozpoczęciem badania rozpocząć przepuszczanie azotu przez komorę rękawicową wyposażoną w cały niezbędny sprzęt. Dopilnować, aby podczas manipulowania butelkami i szczelnego zamykania butelek temperatura osadu wynosiła 35 °C ± 2 °C

Badanie wstępne

25. Jeżeli aktywność osadu nie jest znana, zaleca się wykonanie badania wstępnego. Sporządzić próby kontrolne w celu uzyskania na przykład stężeń części stałych wynoszących 10 g/l, 20 g/l i 40 g/l z podłożem, ale bez użycia badanej substancji chemicznej. Należy również stosować różne objętości mieszaniny reakcyjnej w celu uzyskania trzech lub czterech stosunków objętości fazy nadpowierzchniowej względem objętości cieczy. Na podstawie wyników zmierzonej objętości gazów w różnych odstępach czasu wybrać najbardziej odpowiednie warunki umożliwiające dokonywanie dwa razy dziennie pomiarów z pozyskaniem każdego dnia znacznych objętości gazu i obniżeniem ciśnienia przy optymalnej czułości ([1]) i bez zagrożenia eksplozjami.

Dodanie badanych substancji chemicznych

26. Napełnić puste butelki badawcze rozpuszczalnymi w wodzie badanymi substancjami chemicznymi (pkt 12 lit. b)) w formie roztworów wodnych (pkt 18). W odniesieniu do każdego zakresu stężeń stosować zbiory butelek obejmujące co najmniej trzy naczynia (pkt 20). W przypadku gdy badana substancja chemiczna nie rozpuszcza się lub słabo się rozpuszcza, przy użyciu mikrostrzykawki wstrzyknąć jej roztwory w rozpuszczalnikach organicznych do pustych butelek w celu uzyskania zbiorów kontrprób każdego

([1]) Dotyczy to zestawu doświadczalnego i warunków doświadczalnych, w których można oszacować objętości wytworzonego gazu – w ślepych próbach kontrolnych i naczyniach wykazujących 70–80 % zahamowania – z dopuszczalnymi marginesami błędu.

▼M6

z pięciu stężeń badanej substancji chemicznej. Odparować rozpuszczalnik przez przepuszczenie strumienia azotu nad powierzchnią roztworów w butelkach badawczych. Alternatywnie dodać nierozpuszczalną stałą substancję chemiczną w formie ważonych ilości substancji chemicznej bezpośrednio do butelek badawczych.

27. Jeżeli nie dodaje się nierozpuszczalnych i słabo rozpuszczalnych w wodzie ciekłych badanych substancji chemicznych przy użyciu rozpuszczalnika, dodać je za pomocą mikrostrzykawki bezpośrednio do butelek badawczych po dodaniu inokulum i substratu użytego w badaniu (zob. pkt 30). W ten sam sposób można dodawać lotne badane substancje chemiczne.

Dodanie inokulum i substratu

28. Wmieszać odpowiednią objętość przesianego osadu fermentującego (zob. pkt 16) w 5-litrowej butelce (pkt 12 lit. g)), przy jednoczesnym przepuszczaniu strumienia azotu przez fazę nadpowierzchniową. W celu usunięcia powietrza wypłukać butelki badawcze, zawierające roztwory wodne lub odparowane roztwory badanej substancji chemicznej z rozpuszczalnikiem, pod strumieniem azotu przez około dwie minuty. Umieścić podwielokrotności, np. 100 ml, dobrze wymieszanego osadu w butelkach badawczych za pomocą pipety z dużą końcówką lub cylindra miarowego. Istotne jest napełnienie pipety jednorazowo dokładną wymaganą objętością osadu ze względu na łatwość osadzania się części stałych osadu. W przypadku pobrania zbyt dużej ilości osadu należy opróżnić pipetę i jeszcze raz pobrać osad.

29. Następnie należy dodać wystarczającą ilość roztworu substratu (pkt 17), aby każda pożywka bulionowa, wyciąg z drożdży i D-glukoza w mieszaninie uzyskały stężenie wynoszące 2 g/l, a jednocześnie nadal płukać azotem. Poniżej przedstawiono przykład dla badanych partii.

Końcowe stężenie masowe badanej substancji chemicznej w butelkach badawczych (mg/l)	Objętość badanej substancji chemicznej (ml)		Odczynniki i podłoża (ml)		
	Roztwór podstawowy a) 10 g/l pkt 18	Roztwór podstawowy b) 1 g/l pkt 18	Woda rozcieńczająca pkt 14	Inokulum pkt 16	Podłoże pkt 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

Całkowita pojemność butelki = 160 ml. Objętość cieczy = 103 ml.
Objętość gazu = 57 ml lub 35,6 % całkowitej objętości.

30. Podobnie przepłukać dostatecznie azotem puste butelki badawcze, aby móc w nich usunąć wszelkie lotne lub nierozpuszczalne ciekłe badane substancje chemiczne (zob. pkt 27).

▼M6

Próby kontrolne i substancja chemiczna odniesienia

31. W celu sporządzenia próby kontrolnej zastosować zestawy butelek obejmujące co najmniej trzy naczynia, zawierające wyłącznie osad i podłoże. Przygotować kolejne butelki z kontrpróbą zawierające osad i podłoże oraz wystarczającą ilość roztworu podstawowego substancji chemicznej odniesienia, 3,5-dichlorofenolu (pkt 21), potrzebną do uzyskania stężenia końcowego wynoszącego 150 mg/l. Takie stężenie powinno hamować wytwarzanie gazu o około 50 %. Alternatywnie przygotować zakres stężeń substancji chemicznej odniesienia. Ponadto przygotować cztery dodatkowe butelki do pomiaru pH zawierające osad, odtlenioną wodę i podłoże. Dodać badaną substancję chemiczną do dwóch butelek w najwyższych badanych stężeniach, a do pozostałych dwóch butelek dodać odtlenioną wodę.

32. Zapewnić, aby wszystkie butelki – butelki badawcze, butelki zawierające substancje chemiczne odniesienia i butelki do prób kontrolnych – zawierały tę sama objętość (V_R) cieczy; w razie konieczności dodać odtlenioną wodę dejonizowaną (pkt 14), aby osiągnąć tę wymaganą objętość. Faza nadpowierzchniowa powinna stanowić 10–40 % pojemności butelki, a jej faktyczną wartość ustala się na podstawie danych uzyskanych w badaniu wstępnym. Po dodaniu wszystkich składników do butelek usunąć igłę, przez którą wypływa gaz, i szczelnie zamknąć każdą butelkę za pomocą kauczukowego korka z nasadką aluminiową (pkt 12 lit. b)), zwilżając korek kroplą wody dejonizowanej, aby ułatwić jego umieszczenie. Wstrząsnąć każdą butelką w celu wymieszania jej zawartości.

Inkubacja butelek

33. Przenieść butelki do regulowanego termostatycznie inkubatora, najlepiej wyposażonego we wstrząsarkę, i utrzymywanego w temperaturze 35 °C ± 2 °C. Butelki inkubuje się bez dostępu światła. Po upływie około godziny wyrównać ciśnienie w butelkach do ciśnienia atmosferycznego, wprowadzając igłę strzykawki dołączoną do ciśnieniomierza (pkt 12 lit. c)) kolejno przez korek każdej butelki, otworzyć zawór i odczekać aż ciśnieniomierz wskaże zero, po czym zamknąć zawór. Igłę należy umieścić pod kątem około 45° w celu uniemożliwienia wyciekania gazu z butelek. Jeżeli butelki są inkubowane w inkubatorach bez wstrząsarek, dwa razy dziennie ręcznie wstrząsać każdą butelką przez cały okres inkubacji w celu stabilizacji układu. Inkubować butelki i odwrócić je w celu uniemożliwienia jakiejkolwiek utraty gazu przez septę. Odwracanie nie jest jednak wskazane w przypadkach gdy nierozpuszczalne badane substancje chemiczne mogą przylegać do dna kolby.

Pomiar ciśnienia

34. Jeżeli butelki osiągnęły temperaturę 35 °C ± 2 °C, zmierzyć i zanotować wartość pH zawartości dwóch z czterech butelek przygotowanych do celów badania, a następnie usunąć ich zawartość; kontynuować inkubowanie pozostałych butelek bez dostępu światła. Mierzyć i notować wartość ciśnienia w butelkach dwa razy dziennie przez kolejne 48–72 godziny, wprowadzając igłę ciśnieniomierza przez korek każdej kolejnej butelki, przy czym pomiędzy pomiarami należy igłę osuszyć. W czasie pomiaru przechowywać wszystkie elementy butelki w temperaturze inkubacji, a pomiar ten należy przeprowadzić możliwie najszybciej. Umożliwić ustabilizowanie i zanotowanie odczytu ciśnienia. Następnie otworzyć zawór w celu wentylacji i zamknąć, gdy ciśnieniomierz wskaże zero. Kontynuować badanie zwykle przez 48 godzin od momentu pierwszego wyrównania ciśnienia, oznaczonego jako „godzina 0”. Liczba odczytów i powtórzeń wentylacji powinna być ograniczona w przypadku lotnych substancji chemicznych do jednego (pod koniec inkubacji) lub dwóch w celu minimalizacji straty badanej substancji chemicznej (10).

35. W przypadku odczytu ciśnienia wskazującego na wartości ujemne nie otwierać zaworu. W igle i rurkach strzykawek zbiera się czasem wilgoć, na co wskazują niewielkie ujemne wartości odczytu ciśnienia. W takim przypadku należy igłę wyjąć, wstrząsnąć rurką, wysuszyć ją za pomocą bibuły, a następnie podłączyć nową igłę.

Pomiar pH

36. Zmierzyć i zanotować wartość pH zawartości każdej butelki po przeprowadzeniu końcowego pomiaru ciśnienia.

▼M6

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Przedstawienie wyników

37. Obliczyć sumę i średnią wartości ciśnienia zanotowanych w każdym odstępie czasowym w odniesieniu do każdego zbioru butelek z kontrpróbą i obliczyć średnie sumaryczne ciśnienie gazu brutto w każdym odstępie czasowym w odniesieniu do każdego zbioru kontrprób. Wykreślić krzywe średniego sumarycznego wytwarzania gazu (Pa) w funkcji czasu w odniesieniu do butelek z próbą kontrolną, butelek badawczych i butelek odniesienia. Wybrać czas na liniowej części krzywej, zwykle 48 godzin, i na podstawie poniższego równania obliczyć procentowe zahamowanie (I) w odniesieniu do każdej wartości stężenia [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

gdzie

I procentowe zahamowanie, wyrażone w %;

P_t ciśnienie gazu wytworzone za pomocą badanego materiału w wybranym czasie, wyrażone w paskalach (Pa);

P_c ciśnienie gazu wytworzone w próbie kontrolnej w tym samym czasie, wyrażone w paskalach (Pa).

Zaleca się sporządzenie obu wykresów, tj. wykresu I w funkcji stężenia oraz w funkcji logarytmu stężenia, tak aby można było wybrać krzywą o bardziej liniowym kształcie. Ocenić wartość EC_{50} (mg/l) wizualnie lub za pomocą analizy regresji na podstawie krzywej o bardziej liniowym kształcie. Do celów porównawczych bardziej przydatne może być wyrażenie stężenia substancji chemicznej jako mg substancji chemicznej / g całkowitej zawartości części stałych. Aby uzyskać to stężenie, należy podzielić stężenie objętościowe (mg/l) przez stężenie objętościowe części stałych suchego osadu (g/l) (pkt 16).

38. Obliczyć procentowe zahamowanie spowodowane przez określone stężenie zastosowanej substancji chemicznej odniesienia lub EC_{50}, jeżeli zbadano wystarczającą liczbę stężeń.

39. Przeliczyć średnie ciśnienie gazu wytworzonego w próbie kontrolnej P_c (Pa) na objętość, odnosząc się do krzywej kalibracyjnej ciśnieniomierza (dodatek 2) i na podstawie tego obliczyć wydajność gazową, wyrażoną jako objętość wytworzona w ciągu 48 godzin ze 100 ml nierozcieńczonego osadu w stężeniu części stałych wynoszącym od 2 % (20 g/l) do 4 % (40 g/l).

Kryteria ważności

40. Wyniki uzyskane w międzylaboratoryjnym badaniu ISO (5) wykazały, że substancja chemiczna odniesienia (3,5-dichlorofenol) wywołała 50-procentowe zahamowanie wytwarzania gazu w zakresie stężeń wynoszącym 32–510 mg/l przy średniej wartości 153 mg/l (10). Zakres ten jest tak szeroki, że nie można z wystarczającą pewnością wyznaczyć stałych limitów w odniesieniu do zahamowania jako kryteriów ważności; możliwość taka powinna istnieć w przypadkach, w których rezultaty badań wykazały, w jaki sposób można wytworzyć bardziej spójne inokula. Objętości gazu wytworzonego w kontrolnych butlach w ciągu 48 godzin wahały się w zakresie 21–149 ml/g suchej masy osadu (ze średnią 72 ml/g). Nie istniał żaden oczywisty związek między objętością wytworzonego gazu a odpowiadającą jej wartością EC_{50}. Końcowa wartość pH wahała się w zakresie 6,1–7,5.

41. Badanie uważa się za ważne, jeżeli w próbie kontrolnej odniesienia zawierającej 150 mg/l 3,5-dichlorofenolu uzyska się zahamowanie większe niż 20 %, w próbie ślepej wytworzy się ponad 50 ml gazu na gram suchej masy, a na końcu badania wartość pH mieści się w zakresie 6,2–7,5.

Sprawozdanie z badania

42. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje.

Badana substancja chemiczna

— nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna, numer CAS, wzór strukturalny i istotne właściwości fizykochemiczne;

▼M6

— czystość (zanieczyszczenia) badanej substancji chemicznej.

Warunki badania

— objętości zawartości ciekłych i fazy nadpowierzchniowej w naczyniach badawczych;

— opisy naczyń badawczych i pomiar gazu (np. rodzaj ciśnieniomierza);

— wprowadzenie badanej substancji chemicznej i substancji chemicznej odniesienia do układu badawczego, zastosowane badane stężenie i stosowanie wszelkich rozpuszczalników;

— informacje dotyczące zastosowanego inokulum: nazwa oczyszczalni ścieków, opis źródła oczyszczonych ścieków (np. temperatura robocza, czas retencji osadu, głównie ścieki domowe lub przemysłowe itd.), stężenie części stałych, aktywność wytwarzania gazu w beztlenowej komorze fermentacyjnej, poprzednie narażenie lub ewentualna wstępna adaptacja do toksycznych substancji chemicznych lub miejsce pobrania szlamu, osadu itp.;

— temperatura i zakres inkubacji;

— liczba kontrprób.

Wyniki

— wartości pH pod koniec badania;

— w razie potrzeby wszystkie dane zmierzone w naczyniach badawczych, naczyniach z próbą ślepą i naczyniach z próbą kontrolną wykonaną na substancji chemicznej odniesienia (np. ciśnienie w Pa lub milibarach) w formie tabeli;

— procentowe zahamowanie w butelkach badawczych i butelkach odniesienia oraz krzywe wykresu zahamowanie–stężenie;

— obliczenie wartości EC_{50}, wyrażonych w mg/l i mg/g;

— wytwarzanie gazu na gram osadu w ciągu 48 godzin;

— uzasadnienie ewentualnego odrzucenia wyników badania;

— omówienie wyników, obejmujące wszelkie odchylenia od procedur stosowanych w tej metodzie badawczej, oraz omówienie wszelkich odchyleń w wynikach badania w stosunku do oczekiwanych wyników, wynikających z interferencji i błędów;

— określenie, czy celem badania było zmierzenie toksyczności dla mikroorganizmów wstępnie narażonych, czy dla takich, które nie były wstępnie narażone.

BIBLIOGRAFIA

(1) Rozdział C.11 niniejszego załącznika: Osad czynny, badanie zahamowania oddychania.

(2) Rozdział C.43 niniejszego załącznika: Biodegradowalność beztlenowa związków organicznych w przefermentowanym osadzie: za pomocą pomiaru wytwarzanego gazu.

(3) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (2003) ISO 13641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.

(4) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (2003) ISO 13641-2 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) ISO (2000) badanie międzylaboratoryjne ISO 13641-1 i ISO 13641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼**M6**

(6) Swanwick JD, 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, w: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton DR, Tiedje JM (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, 2 441-2 460.

(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, Niemcy (1990). wyd. Steinberg C i Kettrup A, s. 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.

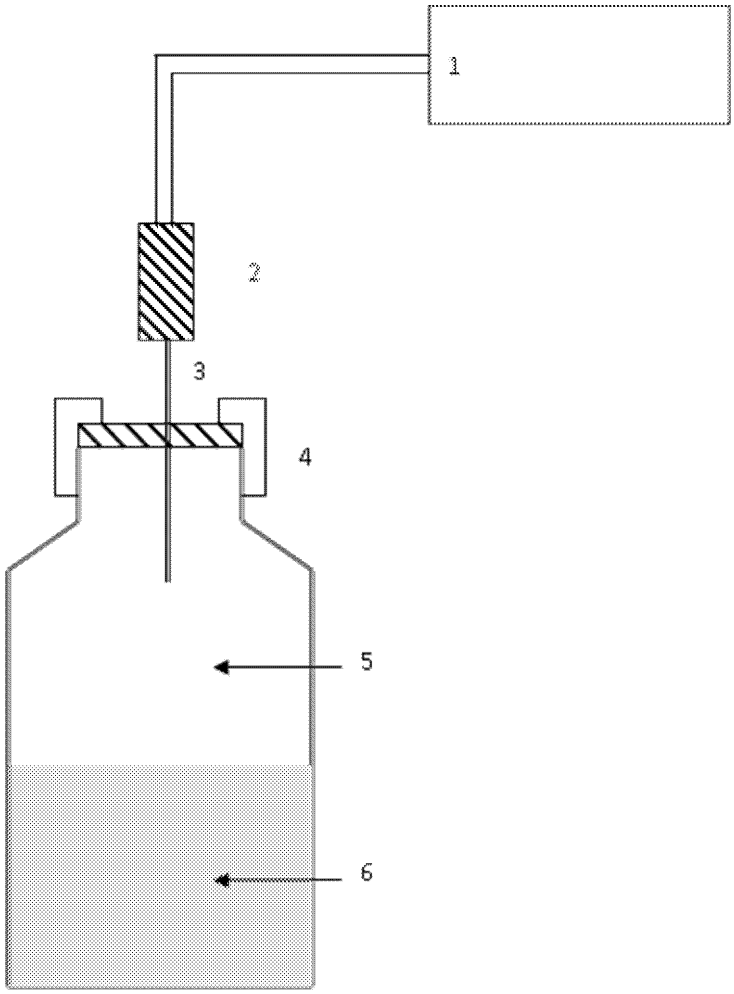
(12) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (1995) ISO 10634 Jakość wody – Wytyczne dotyczące przygotowania i obróbki słabo rozpuszczalnych związków organicznych w celu oceny ich biodegradacji w środowisku wodnym.

(13) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (1997) ISO 11923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Dodatek 1

Przykład aparatury do mierzenia wytwarzania biogazu na podstawie ciśnienia gazu



Legenda:

1 – ciśnieniomierz

2 – gazoszczelny zawór 3-drogowy

3 – igła do strzykawki

4 – gazoszczelny korek (obciskana nasadka i septa)

5 – faza nadpowierzchniowa

6 – inokulum z przefermentowanego osadu

Naczynia badawcze w środowisku o temperaturze 35 °C ± 2 °C

▼M6

Dodatek 2

Przeliczanie odczytów ciśnieniomierza

Odczyty z ciśnieniomierza można powiązać z objętościami gazu, wykorzystując w tym celu standardową krzywą i na podstawie tego można obliczyć objętość gazu wytworzoną na gram suchego osadu w ciągu 48 godzin. Ten wskaźnik aktywności stosuje się jako jedno z kryteriów oceny ważności wyników badań. Krzywą kalibracyjną wykreśla się na podstawie wstrzykiwania znanych objętości gazu w temperaturze 35 °C ± 2 °C do butelek do surowicy, zawierających objętość wody równą objętości mieszaniny reakcyjnej V_R;

— umieścić podwielkrotności V_R ml wody, utrzymywane w temperaturze 35 °C ± 2 °C, w pięciu butelkach do surowicy. Butelki szczelnie zamknąć i pozostawić na 1 godzinę w łaźni wodnej w temperaturze 35 °C ± 2 °C do stabilizacji;

— włączyć ciśnieniomierz, poczekać aż się ustabilizuje, i ustawić wartość zerową;

— wprowadzić igłę strzykawki przez korek jednej z butelek, otworzyć zawór i odczekać aż ciśnieniomierz wskaże zero, po czym zamknąć zawór;

— procedurę tę należy powtórzyć w przypadku pozostałych butelek;

— do każdej butelki wstrzyknąć 1 ml powietrza o temperaturze 35 °C ± 2 °C. Wprowadzić igłę (na mierniku) przez korek jednej z butelek i poczekać, aż odczyt ciśnienia ustabilizuje się. Zanotować ciśnienie, otworzyć zawór i odczekać, aż ciśnieniomierz wskaże zero, po czym zamknąć zawór;

— procedurę tę należy powtórzyć w przypadku pozostałych butelek;

— powtórzyć całą procedurę z zastosowaniem 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml i 50 ml powietrza;

— wykreślić krzywą przeliczeniową ciśnienia (Pa) w funkcji objętości wstrzykniętego gazu (ml). Dane wskazane przez instrument mają charakter liniowy w zakresie od 0 Pa do 70 000 Pa oraz od 0 ml do 50 ml wytwarzanego gazu.

▼M6

Dodatek 3

Zidentyfikowane czynniki, które mogą prowadzić do błędnych wyników

a) *Jakość nasadek do butelek*

W handlu dostępne są różne rodzaje sept do butelek do surowicy; wiele z nich, w tym butylowe septy kauczukowe, tracą gazoszczelność po przekłuciu igłą w warunkach tego badania. Czasami po przekłuciu septy igłą strzykawki ciśnienie spada bardzo wolno. Zaleca się stosowanie gazoszczelnych sept w celu uniknięcia wycieków (pkt 12 lit. b)).

b) *Wilgoć w igle strzykawki*

W igle i rurkach strzykawek zbiera się czasem wilgoć wykazana przez odczyty ciśnienia wskazujące niewielkie wartości ujemne. Aby pozbyć się wilgoci, należy usunąć igłę, wstrząsnąć rurką, wysuszyć ją za pomocą bibuły, a następnie podłączyć nową igłę (pkt 12 lit. c) i pkt 35).

c) *Zanieczyszczenie tlenem*

Metody beztlenowe podlegają błędom wynikającym z zanieczyszczenia tlenem, które może spowodować mniejsze wytwarzanie gazu. W tej metodzie możliwość zanieczyszczenia tlenem powinna być zminimalizowana przez zastosowanie wyłącznie technik beztlenowych, w tym komory rękawicowej.

d) *Wyraźne elementy podłoża w osadzie*

Na beztlenowe wytwarzanie gazu i wrażliwość osadu wpływają elementy podłoża przenoszone z inokulum do butelek badawczych. Przefermentowany osad pochodzący z domowych beztlenowych komór fermentacyjnych często dalej zawiera rozpoznawalną materię, taką jak pozostałości włosów i roślin w celulozie, które zwykle utrudniają pobieranie próbek reprezentatywnych. Można usunąć wyraźną nierozpuszczalną materię z osadu poprzez przesianie, co zwiększy prawdopodobieństwo próbek reprezentatywnych (pkt 16).

e) *Lotne badane substancje chemiczne*

Lotne badane substancje chemiczne zostaną uwolnione do fazy nadpowierzchniowej butelek badawczych. Takie uwolnienie może skutkować utratą niektórych badanych materiałów z układu w czasie odgazowywania po pomiarze ciśnienia i błędnym wykazaniem wysokich wartości EC_{50}. Odpowiednio wybierając stosunek objętości fazy nadpowierzchniowej względem objętości cieczy i nie odgazowując po zmierzeniu ciśnienia, można ograniczyć błąd (10).

f) *Nieliniowość wytwarzania gazu*

Jeżeli wykres średniego sumarycznego wytwarzania gazu w funkcji czasu inkubacji nie jest w przybliżeniu liniowy w okresie 48 godzin, dokładność badania może być obniżona. Aby rozwiązać ten problem, zalecane może być wykorzystanie osadu fermentującego pochodzącego z różnych źródeł lub dodanie zwiększonego stężenia podłoża użytego w badaniu – pożywki bulionowej, wyciągu z drożdży i glukozy (pkt 29).

▼M6

Dodatek 4

Zastosowanie do próbek środowiskowych o niskim stężeniu biomasy – beztlenowy szlam, osady itp.

WPROWADZENIE

A.1 Ogólnie rzecz biorąc, szczególna aktywność mikrobiologiczna (objętość wytworzonego gazu na gram części stałych) naturalnie występującego szlamu beztlenowego, osadu, gleby itp., jest znacznie niższa niż aktywność mikrobiologiczna beztlenowego osadu pochodzącego ze ścieków. Z tego powodu, jeżeli zmierzone ma zostać działanie hamujące substancji chemicznych w stosunku do tych mniej aktywnych próbek, należy zmodyfikować niektóre warunki doświadczalne. W przypadku tych mniej aktywnych próbek możliwe są dwie ogólne metody działania:

a) wykonanie zmodyfikowanego badania wstępnego (pkt 25) na nierozcieńczonej próbce szlamu, gleby itp. w temperaturze 35 °C ± 2 °C lub w temperaturze miejsca pobrania próbki w celu uzyskania dokładniejszej symulacji (jak w części 1 normy ISO 13641);

b) lub wykonanie badania z rozcieńczonym (1 na 100) osadem pochodzącym z komory fermentacyjnej w celu symulacji niskiej aktywności oczekiwanej w odniesieniu do próbki środowiskowej, ale przy utrzymaniu temperatury 35 °C ± 2 °C (jak w części 2 normy ISO 13641).

A.2 Wariant a) można uzyskać za pomocą następującej metody opisanej tutaj (równoważnej względem części 1 normy ISO 13641), ale konieczne jest wykonanie badania wstępnego (pkt 25) w celu zapewnienia optymalnych warunków, o ile nie są one jeszcze znane na podstawie poprzednich badań. Próbka szlamu lub osadu powinna być dokładnie wymieszana, np. w wytrząsarce, i w razie potrzeby rozcieńczona w niewielkiej ilości odpowietrzonej wody rozcieńczającej (pkt 14), tak aby istniała możliwość przeniesienia jej np. za pomocą pipety o grubej końcówce lub cylindra miarowego. Jeżeli uznaje się, że może brakować składników odżywczych, można odwirować próbkę szlamu (w warunkach beztlenowych) i ponownie zawiesić w pożywce mineralnej zawierającej wyciąg z drożdży (A.11).

A.3 Wariant b). Wariant ten odpowiednio obrazuje niską aktywność próbek środowiskowych, ale wykazuje brak wysokiego stężenia zawiesin występujących w tych próbkach. Nie jest znana rola tych części stałych w zahamowaniu, ale możliwe jest, że reakcja zachodząca między tymi badanymi substancjami chemicznymi i składnikami szlamu oraz adsorpcja badanych substancji chemicznych do części stałych mogłyby obniżyć toksyczność badanej substancji chemicznej.

A.4 Innym istotnym czynnikiem jest temperatura: na potrzeby samej symulacji, badania można wykonywać w temperaturze miejsca pobrania próbki, ponieważ różne grupy konsorcjów bakterii wytwarzających metan funkcjonują w różnych zakresach temperatur, mianowicie baterie termofilne (~ 30–35 °C), mezofilne (20–25 °C) i psychrofilne (< 20 °C), które mogą wykazywać różne modele pod względem zahamowania.

A.5 Czas trwania. W badaniu ogólnym, opisanym w części 1, wykonanym przy zastosowaniu nierozcieńczonego osadu, ilość gazu wytworzonego w ciągu 2–4 dni była zawsze wystarczająca, natomiast w badaniu międzylaboratoryjnym, opisanym w części 2, wykonanym przy zastosowaniu osadu rozcieńczonego w stosunku jeden do stu, w tym samym okresie nie wytworzono gazu lub wytworzono niewystarczającą jego ilość. Madsen i in. (1996), opisując to drugie badanie, stwierdził, że powinno się dopuścić wykonywanie tego badana przez co najmniej 7 dni.

Wykonywanie badania przy niskim stężeniu biomasy (wariant b)

Należy wprowadzić następujące zmiany, dodając treść do niektórych istniejących punktów i podpunktów tekstu głównego lub zastępując te punkty i podpunkty.

▼**M6**

A.6 W pkt 6 dodaje się treść w brzmieniu: zasada badania;

„Tę technikę można wykorzystać w przypadku rozcieńczenia beztlenowego osadu w stosunku 1 do 100, częściowo w celu symulacji niskiej aktywności szlamu i osadów. Temperatura inkubacji może wynosić 35 °C lub może być równa temperaturze miejsca, z którego pobrano próbkę. Ponieważ w nierozcieńczonym osadzie aktywność bakterii jest znacznie mniejsza, okres inkubacji należy wydłużyć do co najmniej 7 dni”.

A.7 W pkt 12 lit. a) dodaje się treść w brzmieniu:

„powinna istnieć możliwość utrzymywania inkubatora w temperaturze minimalnej 15 °C.”.

A.8 Po pkt 13 dodaje się dodatkowy odczynnik:

„kwas fosforowy (H_3PO_4), 85 % masy w wodzie”.

A.9 Na końcu pkt 16 dodaje się zdanie w brzmieniu:

„Zastosować stężenie końcowe całkowitej zawartości części stałych w badaniu wynoszące 0,20 ± 0,05 g/l”.

A.10 Zob. pkt 17. Podłoże użyte w badaniu

Nie należy stosować tego podłoża, ale zastąpić je wyciągiem z drożdży (zob. pkt 17; A.11, A.12, A.13).

A.11 Do beztlenowego rozcieńczania osadu wymagane jest podłoże mineralne, obejmujące pierwiastki śladowe, i dla wygody do tego podłoża dodaje się substrat organiczny – wyciąg z drożdży.

Po pkt 17 dodaje się litery w brzmieniu:

„a) badane podłoże mineralne, zawierające wyciąg z drożdży.

Przygotowuje się je z podłoża o 10-krotnym stężeniu (pkt 17 lit. b; A.12) z roztworem pierwiastka śladowego (pkt 17 lit. c); A.13). Zastosować świeżo dostarczony dziewięciowodny siarczek sodu, (pkt 17 lit. b); A.12) lub przemyć i osuszyć dziewięciowodny siarczek sodu przed zastosowaniem, aby miał wystarczającą zdolność redukcji. Jeżeli badanie jest wykonywane bez wykorzystania komory rękawicowej (pkt 12 lit. j)), należy zwiększyć stężenie siarczku sodu w roztworze podstawowym do 2 g/l (z 1 g/l). Siarczek sodu można też dodać z odpowiedniego roztworu podstawowego przez septę zamkniętych butelek badawczych, ponieważ taka procedura zmniejsza ryzyko utleniania, w celu uzyskania stężenia końcowego wynoszącego 0,2 g/l. Alternatywnie można zastosować cytrynian tytanu (III) (pkt 17 lit. b)). Należy dodać go przez septę zamkniętych butelek badawczych w celu uzyskania stężenia 0,8 mmol/l do 1,0 mmol/l. Cytrynian tytanu (III) stanowi wysoce skuteczny środek redukujący o niskiej toksyczności, który przygotowuje się w następujący sposób: rozpuścić 2,94 g cytrynianu trisodu, dihydratu w 50 ml odtlenionej wody rozcieńczającej (pkt 14) (w wyniku czego powstaje roztwór 200 mmol/l) i dodać 5 ml roztworu chlorku tytanu (III) (15 g/100 ml wody rozcieńczającej). Należy zneutralizować go do pH 7 ± 0,5 za pomocą węglanu sodu i umieścić w odpowiedniej butelce do surowicy pod strumieniem azotu. Stężenie cytrynianu tytanu (III) w tym roztworze podstawowym wynosi 164 mmol/l. Natychmiast zastosować pożywkę lub przechowywać w temperaturze 4 °C nie dłużej niż 1 dzień;

A.12 b) pożywka o dziesięciokrotnym stężeniu, przygotowywana przy użyciu:

bezwodnego diwodorofosforanu potasu (KH_2PO_4)	2,7 g
wodorofosforanu sodu (Na_2HPO_4)	4,4 g
(lub 11,2 g dwunastowodnego wodorofosforanu sodu);	5,3 g
chlorku amonu (NH_4Cl)	

▼**M6**

chlorku wapnia, dwuwodnego ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
chlorku magnezu, sześciowodnego ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
chlorku żelaza (II), czterowodnego ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resaryzuny (wskaźnika redoks)	0,01 g;
siarczku sodu, dziewięciowodnego ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(lub cytrynianu tytanu (III)) stężenie końcowe	0,8 mmol/l do 1,0 mmol/l
roztworu pierwiastka śladowego (zob. pkt 17 lit. c); A.13)	10,0 ml
wyciągu z drożdży	100 g
Rozpuścić w wodzie rozcieńczającej (pkt 14) i dopełnić do:	1 000 ml;

A.13 c) roztwór pierwiastka śladowego, przygotowany przy użyciu:

chlorku manganu (II), czterowodnego ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
kwasu borowego (H_3BO_3)	0,05 g
chlorku cynku ($ZnCl_2$)	0,05 g
chlorku miedzi (II) ($CuCl_2$)	0,03 g
molibdenianu sodu, dwuwodnego ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
chlorku kobaltu (II), sześciowodnego ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
chlorku niklu (II), sześciowodnego ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
selenianu disodu (Na_2SeO_3)	0,05 g
Rozpuścić w wodzie rozcieńczającej (pkt 14) i dopełnić do:	1 000 ml”.

A.14 Zob. pkt 25: badanie wstępne

Konieczne jest wykonanie badania wstępnego zgodnie z opisem zawartym w pkt 24, z tym, że stężenia części stałych osadu powinny wynosić jedną setną podanych stężeń, tj. 0,1 g/l, 0,2 g/l i 0,4 g/l. Czas trwania inkubacji powinien wynosić co najmniej 7 dni.

Uwaga: w badaniu międzylaboratoryjnym (5) objętość fazy nadpowierzchniowej była zbyt wysoka – na poziomie 75 % całkowitej objętości; powinna zawierać się w zalecanym zakresie 10–40 %. Istotne kryterium stanowi, że objętość gazu wytwarzanego przy zahamowaniu na poziomie 80 % powinna być możliwa do zmierzenia z akceptowalną precyzją (np. od ± 5 % do ± 10 %).

A.15 Punkty 26–30: dodanie badanej substancji chemicznej, inokulum i podłoża.

Powyższe substancje dodaje się w taki sam sposób jak opisano w tych punktach, z tym że roztwór podłoża (pkt 17) zastępuje się pożywką oraz podłożem z wyciągu z drożdży (A.11).

Ponadto stężenie końcowe suchych części stałych osadu obniża się z 2 g/l–4 g/l do 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). Dwa przykłady dodania składników do mieszaniny stosowanej w badaniu przedstawiono w tabeli A.1, którą zastępuje się tabelę w pkt 29.

A.16 Punkt 33: inkubacja butelek

Ze względu na mniejszą intensywność wytwarzania gazu, czas trwania inkubacji wynosi co najmniej 7 dni.

▼**M6**

A.17 Punkt 34: pomiary ciśnienia

Do pomiaru ciśnienia fazy nadpowierzchniowej w butelkach stosuje się taką samą procedurę, jaką określono w pkt 34, jeżeli wymagane są wartości w fazie gazowej. Jeżeli wymaga się dokonania pomiaru całkowitych ilości CO_2 plus CH4, pH fazy ciekłej obniża się do około pH 2 poprzez wstrzyknięcie H_3PO_4 do każdej właściwej butelki oraz dokonanie pomiaru po 30 minutach wstrząsania w temperaturze badania. Więcej informacji na temat jakości inokulum można uzyskać jednak poprzez dokonanie pomiaru ciśnienia w każdej butelce przed zakwaszeniem i po zakwaszeniu. Przykładowo, jeżeli intensywność wytwarzania CO_2 jest znacznie wyższa niż intensywność wytwarzania metanu, czułość bakterii fermentacyjnych może ulec zmianie lub badana substancja chemiczna w pierwszej kolejności wywiera wpływ na bakterie metanogenne.

A.18 Punkt 36: pomiar pH

Jeżeli ma zostać zastosowane H_3PO_4, do celów pomiaru pH należy przygotować dodatkowe butelki, do których nie dodaje się H_3PO_4.

BIBLIOGRAFIA

Madsen, T., Rasmussen, H.B. i Nilsson, L. (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Insytut Jakości Wody, Duńska Agencja Ochrony Środowiska, Kopenhaga.

Tabela A.1

Przykłady konfiguracji badawczej dla badanych partii

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Przykład 1	Przykład 2	Normalna kolejność dodawania
Stężenie przygotowanego inokulum (g/l)	0,42	2,1	—
Objętość dodawanego inokulum (ml)	45	9	4
Stężenie inokulum w butelkach badawczych (g/l)	0,20	0,20	—
Objętość dodawanej pożywki (ml)	9	9	2
Objętość dodawanej wody rozcieńczającej (ml)	36	72	3
Stężenie wyciągu z drożdży w butelkach badawczych (g/l)	9,7	9,7	—
Objętość roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej (ml)	3	3	1
Całkowita objętość cieczy (ml)	93	93	—

▼**M6**

Dodatek 5

Definicje

Dla celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M6

C.35. BADANIE TOKSYCZNOŚCI W UKŁADZIE OSAD DENNY-WODA NA *LUMBRICULUS* Z WYKORZYSTANIEM WZBOGACONEGO OSADU

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 225 (2007). Organizmy bentosowe żyjące w osadzie są potencjalnie narażone na związane w osadzie substancje chemiczne, w związku z czym należy zwrócić na nie szczególną uwagę, np. (1), (2), (3). Wśród tych organizmów czerpiących pokarm z osadu znajdują się skąposzczety wodne, których rola w osadach systemów wodnych jest istotna. Przyczyniając się do bioturbacji osadu oraz stanowiąc żer dla innych organizmów, zwierzęta te mogą mieć silny wpływ na biodostępność takich substancji dla innych organizmów, np. ryb poszukujących pokarmu w osadzie. W przeciwieństwie do organizmów żyjących na powierzchni osadów, wodne skąposzczety żyjące w osadach (np. *Lumbriculus variegatus*) zakopują się w osadzie i zjadają cząstki osadu znajdujące się pod jego powierzchnią. Powoduje to narażenie organizmów użytych do badania na badaną substancję chemiczną przez wiele dróg absorpcji (np. przez bezpośredni kontakt i spożycie zanieczyszczonych cząstek osadu, lecz również przez wodę porową i wodę nadosadową).

2. Niniejsza metoda badawcza ma służyć ocenie skutków długotrwałego narażenia żyjących w osadach skąposzczetów *Lumbriculus variegatus* (Müller) na działanie substancji chemicznych związanych z osadem. Metoda ta opiera się na istniejących metodach badania toksyczności osadu i protokołach badania bioakumulacji, np. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Niniejszą metodę opisano w odniesieniu do warunków badania statycznego. Scenariusz narażenia stosowany w tej metodzie badawczej polega na wzbogacaniu osadu badaną substancją chemiczną. Stosowanie wzbogaconego osadu ma na celu symulację osadu zanieczyszczonego badaną substancją chemiczną.

3. Substancje chemiczne, które należy przebadać pod kątem organizmów żyjących w osadach, zwykle pozostają w tym układzie przez długi czas. Organizmy żyjące w osadach mogą być narażone poprzez różne drogi. Względne znaczenie danej drogi narażenia i czas, jaki jest potrzebny, by przyczyniła się ona do ogólnych skutków toksycznych, zależy od fizykochemicznych właściwości danej substancji chemicznej i jej ostatecznego działania na zwierzę. W przypadku silnie adsorbujących substancji chemicznych (np. substancji o log K_{ow} > 5) lub w przypadku substancji chemicznych tworzących wiązania kowalencyjne z osadem drogą narażenia o istotnym znaczeniu może być przyjmowanie zanieczyszczonego pokarmu. Aby nie doprowadzić do zaniżenia toksyczności takich substancji chemicznych, pokarm niezbędny do rozmnażania i rozwoju organizmów używanych do badania dodaje się do osadu przed zastosowaniem badanej substancji chemicznej (11). Niniejszą metodę badawczą przedstawiono w sposób wystarczająco szczegółowy, aby umożliwić wykonanie badania, pozwalając jednocześnie na wprowadzanie zmian w projekcie doświadczenia, w zależności od warunków w konkretnych laboratoriach i zróżnicowanych właściwości badanych substancji chemicznych.

4. Celem niniejszej metody badawczej jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na rozrodczość i biomasę organizmów użytych do badania. Mierzonymi parametrami biologicznymi są całkowita liczba żyjących organizmów oraz zawartość biomasy (suchej masy) na koniec okresu narażania. Dane te poddaje się analizie poprzez zastosowanie modelu regresji celem oszacowania stężenia, przy którym wpływ osiągnąłby poziom x % (np. EC_{50}, EC_{25}, i EC_{10}) albo poprzez zastosowanie metody testowania hipotez statystycznych w celu określenia stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) oraz najniższego stężenia, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC).

5. W rozdziale C.27 niniejszego załącznika, „Badanie toksyczności w układzie osad-woda na ochotkowatych z wykorzystaniem wzbogaconego osadu” (6), zawarto wiele informacji istotnych i przydatnych do zastosowania przedstawionej metody badawczej dotyczącej toksyczności osadu. W związku z tym niniejszy dokument stanowi podstawę, według której opracowano zmiany konieczne do wykonania badań toksyczności osadu z wykorzystaniem gatunku *Lumbriculus variegatus*. Ponadto zawarto odniesienia do takich dokumentów jak: Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates (3) opracowany przez ASTM, Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates (7)

▼M6

opracowany przez EPA oraz Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates (12) opracowany przez ASTM. Dodatkowo głównym źródłem informacji, z którego korzystano przy opracowywaniu niniejszego dokumentu, jest doświadczenie praktyczne zdobyte w trakcie wykonywania badań międzylaboratoryjnych z wykorzystaniem niniejszej metody badawczej (sprawozdanie z badania międzylaboratoryjnego, (13)).

WARUNKI WSTĘPNE I WYTYCZNE

6. Informacje na temat badanej substancji chemicznej, obejmujące np. środki ostrożności, odpowiednie warunki przechowywania i metody analityczne, należy uzyskać przed rozpoczęciem badania. Dalsze wytyczne dotyczące badania substancji chemicznych o własnościach fizykochemicznych utrudniających wykonanie badania przedstawiono w pozycji (14) bibliografii.

7. Przed rozpoczęciem badania powinny być znane następujące informacje o badanej substancji chemicznej:

   — nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna (najlepiej nazwa wg IUPAC), wzór strukturalny, numer CAS, czystość;

   — prężność pary;

   — rozpuszczalność w wodzie.

8. Przed rozpoczęciem badania warto zgromadzić następujące dodatkowe informacje:

   — współczynnik podziału oktanol-woda, K_{ow};

   — współczynnik węgiel organiczny-woda, wyrażony jako K_{oc};

   — hydroliza;

   — fototransformacja w wodzie;

   — biodegradowalność;

   — napięcie powierzchniowe.

9. Informacje na temat niektórych właściwości osadu, jaki należy zastosować, powinno się uzyskać przed rozpoczęciem badania (7). Informacje szczegółowe zawarto w pkt 22–25.

ZASADA BADANIA

10. Osobniki o podobnym stanie fizjologicznym (zsynchronizowane, jak określono w dodatku 5) poddaje się narażeniu na działanie szeregu stężeń substancji toksycznej wprowadzanych do osadu w układzie osad-woda. Jako pożywkę należy stosować sztuczny osad i wodę regenerowaną. Naczynia badawcze bez zawartości badanej substancji chemicznej stanowią próby kontrolne. Badaną substancją chemiczną wzbogaca się całą objętość osadu w odniesieniu do każdego poziomu stężenia, aby ograniczyć do minimum zmienność między kontrpróbami dla każdego poziomu stężenia, a następnie organizmy użyte do badania wprowadza się do naczyń badawczych, w których ustabilizowano stężenia badanej substancji w osadzie i wodzie (zob. pkt 29). Zwierzęta użyte do badań naraża się na działanie substancji chemicznej w układach osad-woda przez 28 dni. W związku z niską zawartością składników odżywczych w osadzie sztucznym, do osadu należy dodać źródło pokarmu (zob. pkt 22–23 oraz dodatek 4), aby organizmy rozwijały się i rozmnażały w warunkach kontrolowanych. W ten sposób można zagwarantować, że zwierzęta użyte do badań będą narażone zarówno przez wodę i osad, jak i przez pożywienie.

11. Preferowanym punktem końcowym w tego rodzaju badaniu jest osiągnięcie EC_x (np. EC_{50}, EC_{25}, i EC_{10}; stężenie, przy którym obserwuje się zmiany mające wpływ na x % organizmów użytych do badania) w odniesieniu do odpowiednio rozrodczości i biomasy, w porównaniu do próby kontrolnej. Należy jednak pamiętać, ze biorąc pod uwagę wysoki stopień niepewności

▼M6

pomiaru niskiego EC_x (np. EC_{10}, EC_{25}) wraz ze skrajnie wysokimi granicami ufności na poziomie 95 % (np. (15)) oraz moc statystyczną obliczaną podczas testu hipotez, za najbardziej wiarygodny punkt końcowy uznaje się EC_{50}. Ponadto można obliczyć stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), oraz najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), w odniesieniu do zawartości biomasy i poziomu rozrodczości, jeżeli obliczenia te znajdują potwierdzenie w projekcie badania i danych (zob. pkt 34–38). Projekt badania będzie zależny od celu badania, jakim jest uzyskanie EC_x lub NOEC.

BADANIA PORÓWNAWCZE

12. Oczekuje się, że zdolność danego laboratorium do wykonywania badania skuteczność zostanie w wystarczającym stopniu wykazana na podstawie badania organizmów kontrolnych, a w przypadku gdy dane historyczne są dostępne, powtarzalności badania. Ponadto można wykonywać porównawcze badania toksyczności w regularnych odstępach czasu, stosując substancję toksyczną odniesienia, aby ocenić wrażliwość organizmów użytych do badania. Porównawcze badania toksyczności trwające 96 godzin wykonywane tylko w wodzie z powodzeniem mogą wykazywać wrażliwość i stan zwierząt użytych do badań (4), (7). Informacje na temat toksyczności pentachlorofenolu (PCP) w pełnych badaniach (narażenie przez 28 dni we wzbogaconym osadzie) zawarto w dodatku 6 oraz w sprawozdaniu dotyczącym badania międzylaboratoryjnego z wykorzystaniem niniejszej metody badawczej (13). Ostrą toksyczność PCP, odnoszącą się wyłącznie do wody, opisano np. w pozycji (16) bibliografii. Informacje te można wykorzystać w celu porównania wrażliwości organizmu użytego do badania w badaniach porównawczych, w których stosuje się PCP jako substancję toksyczną odniesienia. Na potrzeby badania *L. variegatus* zaleca się stosowanie chlorku potasu (KCl) lub siarczanu miedzi ($CuSO_4$) jako substancji toksycznych odniesienia (4) (7). Ustalenie kryteriów jakości w oparciu o dane dotyczące toksyczności KCl do dziś sprawia trudności ze względu na brak danych na temat *L. variegatus* w literaturze. Informacje na temat toksyczności miedzi w stosunku do *L. variegatus* można znaleźć w pozycjach bibliografii (17)–(21).

WAŻNOŚĆ BADANIA

13. Aby badanie było ważne, należy spełnić następujące warunki:

— w badaniu międzylaboratoryjnym (13) należy wykazać, że w przypadku Lumbriculus variegatus średnia liczba żywych osobników na jedną kontrpróbę w próbach kontrolnych powinna wzrosnąć co najmniej 1,8-krotnie na koniec okresu narażenia w stosunku do liczby osobników na kontrpróbę na początku okresu narażenia;

— pH warstwy wody nadosadowej należy utrzymać na poziomie 6–9 przez cały czas trwania badania;

— stężenie tlenu w wodzie nadosadowej nie powinno być niższe niż 30 % wartości nasycenia powietrzem (ASV) w temperaturze badania w trakcie badania.

OPIS METODY BADAWCZEJ

Układ badawczy

14. Zaleca się stosowanie systemów statycznych bez wymiany wody nadosadowej. Jeżeli stosunek osadu do wody (zob. pkt 15) jest odpowiedni, delikatne napowietrzanie jest zwykle wystarczające, aby utrzymać jakość wody na poziomie dopuszczalnym dla organizmów użytych do badania (np. maksymalizacja poziomów stężenia rozpuszczonego tlenu, minimalizacja odkładania się produktów wydalniczych). Układy półstatyczne lub przepływowe z okresowym lub stałym odnawianiem wody nadosadowej należy stosować wyłącznie w wyjątkowych przypadkach, ponieważ oczekuje się, że regularne odnawianie wody nadosadowej naruszy równowagę chemiczną (np. spowoduje utratę badanej substancji chemicznej z układu badawczego).

Naczynia badawcze i aparatura badawcza

15. Narażenie przeprowadza się w szklanych zlewkach o pojemności 250 ml i średnicy 6 cm. Inne naczynia także mogą nadawać się do badania, powinny jednak zapewniać odpowiednią głębokość wody nadosadowej i warstwy osadu. W każdym naczyniu należy umieścić warstwę osadu preparowanego

▼M6

o grubości około 1,5–3 cm. Stosunek głębokości warstwy osadu do głębokości wody nadosadowej powinien wynosić 1:4. Naczynia powinny mieć odpowiednią pojemność, zgodnie ze wskaźnikiem obciążenia, tj. liczbą badanych osobników dodawanych na jednostkę masy osadu (zob. również pkt 39).

16. Naczynia badawcze i inna aparatura badawcza, mające kontakt z badaną substancją chemiczną, powinny być w całości wykonane ze szkła lub innych chemicznie obojętnych materiałów. W odniesieniu do wszystkich części sprzętu należy starać się unikać stosowania materiałów, które mogą rozpuścić badaną substancję chemiczną, sprawić, że ulegnie ona absorpcji, lub też wypłukać inne substancje chemiczne, a także materiałów, które mają szkodliwe działanie na zwierzęta użyte do badań. Sprzęt mający kontakt z badanymi pożywkami musi być wykonany z politetrafluoroetylenu (PTFE), ze stali nierdzewnej lub szkła. W przypadku organicznych substancji chemicznych wymagane może być użycie szkła silanizowanego. W takich sytuacjach sprzęt po użyciu należy wyrzucić.

Badany gatunek

17. Badanym gatunkiem wykorzystywanym w tym badaniu jest słodkowodny skąposzczet *Lumbriculus variegatus* (Müller). Gatunek ten toleruje różne rodzaje osadu i jest powszechnie stosowany w badaniach toksyczności i bioakumulacji (np. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)). W sprawozdaniu należy przedstawić pochodzenie zwierząt użytych do badań, potwierdzenie identyfikacji gatunku (np. (36)) oraz warunki hodowli. Potwierdzenie identyfikacji gatunku nie jest wymagane przed każdym badaniem, jeśli organizmy pochodzą z hodowli wewnątrzlaboratoryjnej.

Hodowla organizmów używanych do badania

18. Aby zapewnić wystarczającą liczbę osobników do wykonania badań toksyczności osadu, warto przechowywać je w stałej hodowli laboratoryjnej. Wytyczne dotyczące metod hodowli *Lumbriculus variegatus* oraz źródeł hodowli starterowych zawarto w dodatku 5. Aby uzyskać szczegółowe informacje na temat tworzenia hodowli tego gatunku, zob. (3), (7), (27).

19. W mieć pewność, że w badaniach stosowano zwierzęta tego samego gatunku, zdecydowanie zaleca się tworzenie hodowli jednego gatunku. Należy zadbać, aby hodowle, a w szczególności osobniki wykorzystywane w badaniach, nie wykazywały dających się zaobserwować oznak chorób ani anomalii.

Woda

20. Zgodnie z rozdziałem C.1 niniejszego załącznika (37) w badaniach zaleca się stosowanie wody regenerowanej jako wody nadosadowej; można wykorzystywać ją również w laboratoryjnych hodowlach organizmów (zob. dodatek 2, aby uzyskać informacje na temat przygotowania). W razie potrzeby można stosować wodę naturalną. Jakość wybranej wody powinna umożliwiać rozwój i rozmnażanie badanych gatunków przez okres trwania aklimatyzacji i okres badań, a także nie powodować pojawiania się ich nietypowego wyglądu lub zachowania. Wykazano, że w takiej wodzie osobniki z gatunku *Lumbriculus variegatus* są w stanie przeżyć, rozwijać się i rozmnażać (30), a także zapewnia się w ten sposób maksymalną standaryzację warunków badania i hodowli. W przypadku gdy stosuje się wodę regenerowaną, w sprawozdaniu należy podać jej skład oraz właściwości przed użyciem, w tym co najmniej odczyn pH, zawartość tlenu oraz twardość (wyrażoną jako mg $CaCO_3$/l). Wykonanie badania wody na obecność mikrozanieczyszczeń przed jej użyciem może dostarczyć również użytecznych informacji (zob. np. dodatek 3).

21. Odczyn pH wody nadosadowej powinien mieścić się w przedziale 6,0–9,0 (zob. pkt 13). Jeżeli oczekuje się podniesienia poziomu amoniaku, za użyteczne uznaje się utrzymywanie pH na poziomie 6,0–8,0. W przypadku wykonywania badań np. słabych kwasów organicznych zaleca się dostosowanie pH poprzez buforowanie wody, która ma zostać wykorzystana na potrzeby badania, w sposób opisany np. w pozycji bibliografii (16). Całkowita twardość wody stosowanej w badaniu powinna wynosić 90–300 mg $CaCO_3$ na litr w przypadku wody naturalnej. W dodatku 3 zawarto podsumowanie dodatkowych kryteriów dotyczących dopuszczalnej wody rozcieńczającej według wytycznej OECD nr 210 (38).

▼M6

Osad

22. Ponieważ niezanieczyszczone, naturalne osady pochodzące z określonego źródła mogą nie być dostępne przez cały rok, a organizmy rodzime oraz obecność mikrozanieczyszczeń mogą mieć wpływ na badanie, w opisanym tu badaniu zaleca się stosowanie osadu preparowanego (zwanego również osadem regenerowanym, sztucznym lub syntetycznym). Stosowanie osadu preparowanego i wprowadzenie rodzimej fauny ograniczają do minimum zmienność warunków badania. Zgodnie z (6), (39) i (40) podstawę opisanego poniżej osadu preparowanego stanowi osad sztuczny. Na potrzeby tego badania zaleca się stosowanie ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):

    a) 4–5 % torfu sfagnowego (w przeliczeniu na suchą masę); ważne jest, by stosować torf w postaci sproszkowanej, o „średnim" stopniu rozkładu, drobno zmielonego (wielkość cząstek ≤0,5 mm); suszonego wyłącznie powietrzem;

    b) 20 ± 1 % glinki kaolinowej (w przeliczeniu na suchą masę) (zawartość kaolinitu najlepiej powyżej 30 %);

    c) 75–76 % piasku kwarcowego (w przeliczeniu na suchą masę) (drobnego piasku o wielkość ziaren: ≤ 2 mm, ale > 50 % cząstek powinno mieścić się w przedziale 50–200 μm);

    d) wody dejonizowanej, 30-50 % suchej masy osadu, oprócz suchych składników osadu;

    e) chemicznie czysty węglan wapnia ($CaCO_3$) dodaje się w celu dostosowania pH końcowej mieszaniny osadu;

    f) zawartość całkowitego węgla organicznego w mieszaninie końcowej powinna wynosić 2 % (± 0,5 %) suchej masy osadu i należy ją dostosować przy użyciu odpowiednich ilości torfu i piasku, zgodnie z lit. a) i c);

    g) np. sproszkowanych liści pokrzywy zwyczajnej (z gatunku *Urtica*, zgodnie z farmaceutycznymi standardami dotyczącymi spożycia przez ludzi) lub mieszaniny sproszkowanych liści z gatunku *Urtica* i alfa celulozy (1:1) na poziomie 0,4–0,5 % suchej masy osadu jako dodatku do składników suchego osadu; aby uzyskać więcej informacji, zob. dodatek 4.

23. Źródło torfu, glinki kaolinowej, surowca pokarmowego i piasku powinno być znane. Jako dodatek do lit. g) w rozdziale C.27 niniejszego załącznika (6) wymieniono alternatywne surowce roślinne stosowane jako źródła pokarmu: suszone liście morwy białej (*Morus alba*), koniczyny białej (*Trifolium repens*), szpinaku (*Spinacia oleracea*) lub trawy zbóż.

24. Wybrane źródło pokarmu należy dodać przed wzbogaceniem osadu badaną substancją chemiczną lub w jego trakcie. Wybrane źródło pokarmu powinno umożliwić uzyskanie co najmniej dopuszczalnego poziomu rozmnażania w próbach kontrolnych. Wykonanie badania osadu sztucznego lub jego składników na obecność mikrozanieczyszczeń przed ich zastosowaniem może dostarczyć użytecznych informacji. W dodatku 4 opisano przykładowy sposób przygotowania osadu preparowanego. Dopuszczalne jest także mieszanie suchych składników, o ile wykaże się, że po dodaniu wody nadosadowej składniki osadu nie rozdzielają się (np. cząstki torfu nie unoszą się na powierzchni wody) oraz że torf lub osad został poddany dostatecznemu kondycjonowaniu (zob. również pkt 25 i dodatek 4). Osad sztuczny należy scharakteryzować co najmniej pod względem pochodzenia składników, rozkładu wielkości ziaren (procent piasku, iłu i gliny), zawartości całkowitego węgla organicznego, zawartości wody i odczynu pH. Pomiar potencjału redoks jest nieobowiązkowy.

25. W miarę potrzeby, np. do celów związanych z konkretnymi badaniami, naturalne osady z niezanieczyszczonych obszarów mogą również służyć za osad do badań lub hodowli (3). Jeżeli jednak wykorzystuje się osad naturalny, to nie powinien zawierać zanieczyszczeń ani innych organizmów, które mogłyby konkurować z organizmami używanymi do badania lub żerować na tych organizmach, i należy go scharakteryzować, podając co najmniej pochodzenie (miejsce pobrania), pH i zawartość amoniaku w wodzie porowej, zawartość całkowitego węgla organicznego, rozkład wielkości cząstek (procent piasku, iłu i gliny) oraz procentową zawartość

▼M6

wody (7). Pomiar potencjału redoks i pojemności wymiany kationów jest nieobowiązkowy. Zaleca się także, aby przed jego wzbogaceniem badaną substancją chemiczną naturalny osad był przez siedem dni kondycjonowany w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania. Na koniec okresu kondycjonowania należy zebrać i wylać warstwę wody nadosadowej.

26. Jakość użytego osadu powinna umożliwiać przeżycie oraz rozmnażanie organizmów kontrolnych w okresie narażenia, przy czym takie organizmy nie powinny charakteryzować się nietypowym wyglądem ani zachowaniem. Organizmy kontrolne powinny zakopać się w osadzie i pobierać go wraz z pokarmem. Rozmnażanie w próbach kontrolnych powinno odbywać się co najmniej zgodnie z kryterium ważności opisanym w pkt 13. Obecność lub brak na powierzchni osadu odchodów, które wskazują, że organizmy spożywają osad, należy odnotować w sprawozdaniu, co może być pomocne przy interpretacji wyników badania dotyczących dróg narażenia. Dodatkowe informacje na temat przyjmowania osadu można uzyskać, stosując metody opisane w pozycjach bibliografii (24), (25), (44) i (45), w których opisano procesy przyjmowania osadu lub wyboru cząstek przez organizmy użyte do badania.

27. Procedury manipulacji dotyczące osadów naturalnych przed ich zastosowaniem w laboratorium popisano w pozycjach (3), (7) i (12). Informacje na temat przygotowywania i przechowywania osadu sztucznego zalecanego do stosowania w badaniach z wykorzystaniem *Lumbriculus* przedstawiono w dodatku 4.

Zastosowanie badanej substancji chemicznej

28. Osad wzbogaca się badaną substancją chemiczną. Ponieważ oczekuje się, że większość badanych substancji chemicznych charakteryzuje się niską rozpuszczalnością w wodzie, w celu przygotowania roztworu podstawowego w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym (np. acetonie, n-heksanie, cykloheksanie) należy rozpuszczać jak najmniejsze objętości tych substancji. W celu przygotowania roztworów do badań roztwór podstawowy rozcieńcza się przy użyciu tego samego rozpuszczalnika. Toksyczność i lotność rozpuszczalnika oraz rozpuszczalność danej badanej substancji chemicznej w wybranym rozpuszczalniku powinny stanowić główne kryteria wyboru odpowiedniego środka rozpuszczającego. W przypadku każdego poziomu stężenia należy stosować tę samą objętość odpowiedniego roztworu. Należy wzbogacić całą objętość osadu w odniesieniu do każdego poziomu stężenia, aby zminimalizować zmienność stężenia badanej substancji chemicznej między kontrpróbami. Każdy roztwór do badań następnie miesza się z piaskiem kwarcowym, jak opisano w pkt 22 (przykładowo dodaje się 10 g piasku kwarcowego na naczynie badawcze). Aby całkowicie nasączyć piasek kwarcowy, na każdy gram piasku wystarczy dodać 0,20–0,25 ml roztworu. Następnie rozpuszczalnik należy odparować do sucha. Aby zminimalizować straty badanej substancji chemicznej w wyniku łącznego parowania (np. w zależności od prężności pary danej substancji chemicznej), powleczony substancją piasek należy użyć natychmiast po osuszeniu. Suchy piasek miesza się z odpowiednią ilością osadu preparowanego o właściwym poziomie stężenia. Należy mieć na uwadze, że przy preparowaniu osadu należy uwzględniać piasek zawarty w mieszaninie badanej substancji chemicznej i piasku (zatem osad należy przygotować z mniejszą ilością piasku). Największą zaletą tej procedury jest to, że do osadu praktycznie nie wprowadza się rozpuszczalnika (7). Ewentualnie, na przykład w przypadku osadów pobranych w terenie, badaną substancję chemiczną można dodać poprzez wzbogacanie osuszonej i drobno zmielonej części osadu, zgodnie z opisem dotyczącym piasku kwarcowego przedstawionym powyżej, lub poprzez wmieszanie badanej substancji chemicznej do mokrego osadu, a następnie przeprowadzić etap odparowania, jeśli zastosowano środek rozpuszczający. Należy dopilnować, by badana substancja chemiczna dodana do osadu została w nim starannie i równomiernie rozprowadzona. W razie potrzeby dla określenia jednorodności mieszanki można przeanalizować podpróbki w celu potwierdzenia docelowych poziomów stężenia w osadzie oraz w celu określenia stopnia jednorodności. Użyteczne może również być przeprowadzenie analizy podpróbek roztworu do badań w celu potwierdzenia docelowych poziomów stężeń w osadzie. Ponieważ do celów powlekania piasku kwarcowego warstwą badanej substancji chemicznej używa się rozpuszczalnika, należy wykorzystać próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem, którą przygotowuje się, dodając tyle samo rozpuszczalnika co badanych osadów. Metodę zastosowaną do wzbogacania oraz

▼M6

uzasadnienie wyboru określonej procedury wzbogacania, innej niż procedury opisanej powyżej, należy przedstawić w sprawozdaniu. Metodę wzbogacania można dostosować do właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, np. aby uniknąć strat w wyniku ulatniania się podczas wzbogacania lub wyrównywania stężeń. Dodatkowe wytyczne dotyczące procedur wzbogacania przedstawiono w Environment Canada (1995) (46).

29. Po przygotowaniu wzbogaconego osadu, rozprowadzeniu go do naczyń badawczych z kontrpróbą i zalaniu wodą do badania, należałoby umożliwić rozdzielenie badanej substancji chemicznej między fazę wodną i osad (np. (3), (7), (9)). W miarę możliwości powinno się to odbywać w tych samych warunkach temperatury i napowietrzenia, jakie zastosowano na potrzeby badania. Czas wyrównania stężeń zależy od osadu i substancji chemicznych, i może być rzędu kilku godzin lub kilku dni, a w rzadkich przypadkach trwać do kilku tygodni (4–5 tygodni) (np. (27), (47)). W badaniu tym nie oczekuje się osiągnięcia stanu wyrównania stężeń, lecz zaleca się stosowanie okresu wyrównania stężeń trwającego od 48 godzin do 7 dni. W związku z tym czas wystarczający dla degradacji badanej substancji chemicznej będzie ograniczony do minimum. W zależności od celu badania, na przykład jeśli dąży się do odtworzenia warunków otoczenia, wzbogacony osad może być stabilizowany lub „postarzany" przez dłuższy okres.

30. Na koniec tego okresu wyrównania stężeń należy pobrać próbki co najmniej wody nadosadowej i całej objętości osadu co najmniej przy najwyższym stężeniu i przy niższym stężeniu do celów wykonania analizy stężenia badanej substancji chemicznej. Takie oznaczenia analityczne badanej substancji chemicznej powinny umożliwić obliczenie bilansu masy i wyrażenie wyników w oparciu o zmierzone stężenia początkowe. Na ogół pobieranie próbek zakłóca lub niszczy układ osad-woda. W związku z tym stosowanie tych samych kontrprób w celu pobrania próbek osadu i osobników jest na ogół niemożliwe. Należy przygotować dodatkowe naczynia do analizy o odpowiednich wymiarach, które są traktowane w ten sam sposób (łącznie z obecnością organizmów użytych do badania), lecz nie są wykorzystywane do obserwacji biologicznych. Wymiary naczyń należy dobrać tak, aby pozwoliły na uzyskanie odpowiedniej liczby próbek wymaganych w tej metodzie analitycznej. Informacje szczegółowe na temat pobierania próbek przedstawiono w pkt 53.

WYKONANIE BADANIA

Badanie wstępne

31. Jeżeli brakuje informacji na temat toksyczności badanej substancji chemicznej dla *Lumbriculus variegatus*, użyteczne może być wykonanie wstępnego doświadczenia w celu określenia zakresu stężeń, które należy zbadać w ostatecznym badaniu, oraz zoptymalizowania warunków dla wykonania badania ostatecznego. W tym celu stosuje się szereg roztworów o znacznie różniących się od siebie stężeniach badanej substancji chemicznej. Osobniki poddaje się narażeniu na każde stężenie badanej substancji chemicznej przez okres (np. 28 dni, jak w przypadku badania ostatecznego), pozwalający oszacować odpowiednie badane stężenie; kontrpróby nie są wymagane. Zachowanie osobników, na przykład unikanie osadu, co może być spowodowane przez badaną substancję chemiczną lub sam osad, należy obserwować i notować podczas badania wstępnego. W badaniu wstępnym nie należy badać stężeń przekraczających 1 000 mg/kg suchej masy osadu.

Badanie ostateczne

32. W badaniu ostatecznym stosuje się i wybiera co najmniej pięć stężeń, np. na podstawie wyników uzyskanych we wstępnym badaniu ustalającym zakres (pkt 31) oraz zgodnie z opisem przedstawionym w pkt 35, 36, 37 i 38.

▼M6

33. Oprócz serii badanej należy przygotować jedną próbę kontrolną (aby uzyskać informacje na temat powtórzeń, zob. pkt 36, 37 i 38), zawierającą wszystkie składniki, z wyjątkiem badanej substancji chemicznej. Jeżeli wykorzystuje się środek rozpuszczający w celu zastosowania badanej substancji chemicznej, nie powinien on mieć znacznego wpływu na organizmy użyte do badania, jak wykazano w dodatkowej próbie kontrolnej zawierającej wyłącznie rozpuszczalnik.

Projekt badania

34. Projekt badania obejmuje dobór liczby badanych stężeń i ich zróżnicowanie, liczby naczyń zawierających dane stężenie substancji i liczby osobników na jedno naczynie. W pkt 35, 36, 37 i 38 opisano projekty dotyczące oszacowania wartości EC_x i NOEC oraz wykonania badania granicznego.

35. Stężenie efektywne (np. EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) i zakres stężeń, powyżej którego skutki działania badanej substancji chemicznej stają się przedmiotem zainteresowania, należy umieścić między wartościami stężeń objętych badaniem. Należy unikać ekstrapolowania wyników uzyskanych znacznie poniżej najniższego stężenia, przy którym obserwuje się zmiany mające wpływ na organizmy użyte do badania, lub powyżej najwyższego badanego stężenia. Jeżeli – w wyjątkowych przypadkach – dokonano takiej ekstrapolacji, w sprawozdaniu należy przedstawić pełne uzasadnienie.

36. Jeśli ma być oszacowane EC_x, należy zbadać co najmniej pięć stężeń i wykonać przynajmniej trzy kontrpróby dla każdego stężenia; zaleca się wykonanie sześciu kontrprób dla próby kontrolnej lub – jeżeli jest wykorzystywana – próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem w celu poprawy szacunków zmienności w próbach kontrolnych. W każdym przypadku zaleca się stosowanie dostatecznych badanych stężeń, aby umożliwić dobre oszacowanie parametrów modelu. Odstępy między stężeniami nie powinny być większe niż ich dwukrotność (z wyjątkiem przypadków, gdy krzywa zależności stężenie-odpowiedź ma łagodne nachylenie). Liczba kontrprób dla każdej grupy badanej może być zmniejszona, jeśli zwiększy się liczbę badanych stężeń dających odpowiedzi mieszczące się w zakresie 5-95 %. Zwiększanie liczby kontrprób lub zmniejszanie wielkości odstępów między badanymi stężeniami zwykle prowadzi do zawężenia przedziałów ufności dla danego badania.

37. Jeśli celem jest oszacowanie wartości LOEC/NOEC, należy zastosować co najmniej pięć badanych stężeń z co najmniej czterema kontrpróbami (zaleca się wykonanie sześciu kontrprób dla próby kontrolnej lub – jeżeli jest wykorzystywany – próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem w celu poprawy szacunków zmienności w próbach kontrolnych), a współczynnik rozstawienia stężeń nie powinien przekraczać dwóch. Pewne informacje dotyczące mocy statystycznej zebrane podczas testowania hipotezy w badaniu międzylaboratoryjnym metody badawczej znajdują się w dodatku 6.

38. Jeśli nie oczekuje się żadnych zmian aż do 1 000 mg/kg suchej masy osadu (np. w wyniku wstępnego badania ustalającego zakres) lub jeżeli wykonanie badania przy jednym stężeniu będzie odpowiednie, aby potwierdzić wartość NOEC będącą przedmiotem zainteresowania, można wykonać badanie graniczne (stosując jedno badane stężenie i próby kontrolne). W tym drugim przypadku szczegółowe uzasadnienie wyboru stężenia granicznego należy włączyć do sprawozdania z badania. Celem badania granicznego jest wykonanie badania przy dostatecznie wysokim stężeniu, by umożliwić decydentom wykluczenie ewentualnych skutków toksycznych danej substancji chemicznej, a granicę ustala się na poziomie stężenia, co do którego nie przewiduje się, by mogło kiedykolwiek wystąpić. Zaleca się stężenie 1 000 mg/kg (w przeliczeniu na suchą masę). Zazwyczaj koniecznych jest co najmniej sześć kontrprób zarówno dla próby badanej, jak i dla prób kontrolnych. Pewne informacje dotyczące mocy statystycznej zebrane podczas testowania hipotezy w badaniu międzylaboratoryjnym metody badawczej znajdują się w dodatku 6.

Warunki narażenia

Organizmy użyte do badania

39. Badanie wykonuje się, używając co najmniej 10 organizmów na każdą kontrpróbę stosowaną w celu określenia parametrów biologicznych. Wskazana liczba organizmów odpowiada około 50–100 mg mokrej biomasy. Przyjmując, że zawartość suchej masy wynosi 17,1 % (48), można uzyskać

▼M6

około 9–17 mg suchej biomasy na jedno naczynie. Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (U.S.EPA) (2000 (7)) zaleca stosowanie wskaźnika obciążenia nieprzekraczającego 1:50 (stosunek suchej biomasy do zawartości całkowitego węgla organicznego). W przypadku osadu preparowanego, który opisano w pkt 22, odpowiada to około 43 g osadu (w przeliczeniu na suchą masę) na 10 osobników przy zawartości całkowitego węgla organicznego na poziomie 2,0 % suchego osadu. W przypadkach, w których wykorzystuje się więcej niż 10 osobników na jedno naczynie, należy odpowiednio dostosować ilość osadu i nadosadowej.

40. Wszystkie osobniki wykorzystane w konkretnym badaniu powinny pochodzić z tego samego źródła i powinny być w podobnym stanie fizjologicznym (zob. dodatek 5). Należy dobrać osobniki o podobnej wielkości (zob. pkt 39). Zaleca się zważenie podpróbki partii osobników przed rozpoczęciem badania w celu ustalenia średniej masy.

41. Osobniki, które mają zostać wykorzystane do badania, usuwa się z hodowli (aby uzyskać szczegółowe informacje, zob. dodatek 5). Duże (dorosłe) osobniki bez oznak niedawnej fragmentacji przenosi się do szklanych naczyń (np. szalek Petriego) zawierających czystą wodę. Następnie synchronizuje się je, jak opisano w dodatku 5. Po regeneracji trwającej 10–14 dni do celów badania należy wykorzystać nienaruszone i kompletne organizmy podobnej wielkości, które po zastosowaniu delikatnych bodźców mechanicznych aktywnie pływają lub pełzają. Jeśli warunki badania różnią się od warunków hodowli (np. temperatura, warunki oświetlenia i woda nadosadowa), etap aklimatyzacji trwający np. 24 godziny, przy zastosowaniu takich samych warunków w zakresie temperatury, oświetlenia i wody nadosadowej jak w badaniu, powinien być wystarczający, aby osobniki dostosowały się do warunków badania. Przystosowane skąposzczety należy losowo umieścić w naczyniach badawczych.

Karmienie

42. Ponieważ pokarm dodaje się do osadu przed zastosowaniem badanej substancji chemicznej (lub w trakcie jej podawania), osobniki nie są dodatkowo karmione w trakcie badania.

Światło i temperatura

43. Fotoperiod w hodowli komórek i w badaniu zwykle wynosi 16 godzin (3), (7). Należy utrzymywać niskie natężenie światła (np. 100–500 lx), aby imitować warunki naturalne na powierzchni osadu, a także należy dokonywać jego pomiarów co najmniej raz w ciągu okresu narażenia. Temperatura powinna wynosić 20 °C ± 2 °C przez cały czas trwania badania. W ciągu jednego dnia pomiarów różnica temperatury między naczyniami badawczymi nie powinna być wyższa niż ± 1 °C. Naczynia badawcze należy umieścić w sposób losowy w inkubatorze do badań lub w obszarze badania, np. w celu zminimalizowania błędu systematycznego rozrodczości wynikającego z lokalizacji naczynia.

Napowietrzanie

44. Woda nadosadowa w naczyniu badawczym powinna być delikatnie napowietrzana (np. 2–4 pęcherzyki powietrza na sekundę) przez pipetę Pasteura, której koniec znajduje się około 2 cm powyżej powierzchni osadu w celu zminimalizowania zakłóceń osadu. Należy dopilnować, aby stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadło poniżej 30 % wartości nasycenia powietrzem (ASV). Należy kontrolować dopływ powietrza i w razie potrzeby regulować co najmniej raz dziennie w dni robocze.

Pomiary jakości wody

45. Należy wykonać pomiary następujących parametrów jakości wody w wodzie nadosadowej:

Temperatura:	co najmniej w jednym naczyniu badawczym na każdym poziomie stężenia i w jednym naczyniu badawczym prób kontrolnych raz na tydzień oraz na początku i na końcu okresu narażenia; w miarę możliwości można dodatkowo zapisywać temperaturę otaczającego środowiska (powietrze atmosferyczne lub łaźnia wodna), np. w odstępach co godzinę

▼M6

Zawartość rozpuszczonego tlenu:	co najmniej w jednym naczyniu badawczym na każdym poziomie stężenia i w jednym naczyniu badawczym prób kontrolnych raz na tydzień oraz na początku i na końcu okresu narażenia; wyrażona w mg/l i jako % ASV (wartość nasycenia powietrzem)
Dopływ powietrza:	należy kontrolować co najmniej raz dziennie w dni robocze i w razie potrzeby wyregulować
pH:	co najmniej w jednym naczyniu badawczym na każdym poziomie stężenia i w jednym naczyniu badawczym prób kontrolnych raz na tydzień oraz na początku i na końcu okresu narażenia
Całkowita twardość wody:	co najmniej w jednej kontrpróbie prób kontrolnych i w jednym naczyniu badawczym przy najwyższym stężeniu, na początku i na końcu okresu narażenia; wyrażona w mg/l $CaCO_3$
Całkowita zawartość amoniaku:	co najmniej w jednej kontrpróbie prób kontrolnych i w jednym naczyniu badawczym przy każdym poziomie stężenia na początku i na końcu okresu narażenia, kolejno 3 razy w tygodniu; wyrażona w mg/l NH_4^+ lub NH_3 lub jako całkowity azot w postaci amoniaku.

Jeżeli pomiary parametrów jakości wody wymagają usunięcia znaczących próbek wody z naczyń, zaleca się założenie oddzielnych naczyń do wykonywania pomiarów parametrów jakości wody, tak aby stosunek objętości wody do osadu nie uległ zmianie.

Obserwacje biologiczne

46. Podczas narażenia należy obserwować naczynia badawcze, aby ocenić wizualne różnice i zmiany w zachowaniu osobników (np. unikanie osadu, odchody widoczne na powierzchni osadu) w porównaniu z próbami kontrolnymi. Należy odnotowywać obserwacje.

47. Na końcu badania każdą kontrpróbę poddaje się badaniu (dodatkowe naczynia przeznaczone do analizy chemicznej mogą być wyłączone z badania). Należy zastosować odpowiednią metodę, aby odzyskać wszystkie osobniki z naczynia badawczego. Należy zachować ostrożność, aby wszystkie osobniki zostały odzyskane w stanie nienaruszonym. Jedną z możliwych metod jest odsiewanie osobników z osadu. Można w tym celu zastosować sito ze stali nierdzewnej o odpowiedniej wielkości oczek. Większość wody nadosadowej dekantuje się ostrożnie, a pozostały osad i wodę miesza się do uzyskania mułu, który można przepuścić przez sito. Jeżeli użyte zostanie sito o wielkości oczek 500 μm, większość cząstek osadu bardzo szybko przejdzie przez sito; proces przesiewania powinien jednak przebiegać szybko, aby uniemożliwić osobnikom pełzanie w kierunku oczek sita lub przez nie. Zastosowanie sita o wielkości oczek 250 μm uniemożliwi osobnikom wpełzanie w oczka sita lub przeciśnięcie się lub przez nie; należy jednak uważać, aby na sicie pozostało jak najmniej cząstek osadu. Przesiany muł z każdego naczynia z kontrpróbą można powtórnie przesiać w celu zapewnienia odzysku wszystkich osobników. Alternatywną metodę może stanowić ogrzanie osadu przez umieszczenie naczynia badawczego w łaźni wodnej o temperaturze 50–60 °C; osobniki opuszczą roztwór i mogą zostać zebrane z powierzchni osadu za pomocą szerokiej pipety z krawędziami wylotu nadtopionymi nad ogniem. Kolejna możliwa metoda może mieć na celu wytworzenie mułu z osadu i przelanie go do płytkiej szalki o odpowiednim rozmiarze. Osobniki można wyjąć z płytkiej warstwy mułu za pomocą stalowej igły lub pęsety zegarmistrzowskiej (użytej jako widelec, a nie szczypczyki, aby uniknąć uszkodzenia osobników) i przenieść do czystej wody. Po oddzieleniu osobników od mułu osadu opłukuje się je w płynie użytym w badaniu i liczy.

48. Niezależnie od stosowanej metody, laboratoria powinny wykazać, że ich personel jest w stanie odzyskać średnio co najmniej 90 % organizmów z całego osadu. Na przykład do osadu z próby kontrolnej lub do osadu

▼M6

użytego do badania można dodać pewną liczbę organizmów użytych do badania, odzysk może być określony po upływie jednej godziny (7).

49. Należy odnotować i poddać ocenie całkowitą liczbę żywych i martwych osobników w przeliczeniu na kontrpróbę. Następujące grupy osobników uznaje się za martwe:

a) brak reakcji na delikatne bodźce mechaniczne;

b) widoczne są oznaki rozkładu (w połączeniu z punktem „a”);

c) szereg brakujących osobników.

Ponadto żywe osobniki można przypisać do jednej z trzech grup:

a) duże kompletne osobniki (dorosłe) bez zregenerowanych obszarów ciała;

b) kompletne osobniki ze zregenerowanymi obszarami ciała o jaśniejszym kolorze (tj. z nowymi tylnymi częściami, z nowymi przednimi częściami lub z nowymi tylnymi i przednimi częściami);

c) niekompletne osobniki (tj. takie, które przeszły fragmentację, a obszary ich ciała nie zregenerowały się).

Te dodatkowe obserwacje nie są obowiązkowe, ale można je wykorzystać przy dodatkowej interpretacji wyników biologicznych (np. duża liczba osobników przypisanych do grupy c) może wskazywać na opóźnienie w rozmnażaniu lub regeneracji w ramach danego zabiegu). Ponadto jeżeli zaobserwowane zostaną jakiekolwiek różnice w wyglądzie (np. uszkodzenia integumentu, obrzęknięte części ciała) między badanymi osobnikami a osobnikami z próby kontrolnej, fakt ten należy odnotować.

50. Bezpośrednio po policzeniu/dokonaniu oceny, żywe osobniki znalezione w każdej kontrpróbie przenosi się do suchych, uprzednio zważonych i oznakowanych zważonych szalek (jedna na kontrpróbę), a następnie uśmierca, stosując kroplę etanolu na zważoną szalkę. Zważone szalki umieszcza się w piecu suszarniczym w temperaturze 100 ± 5 °C i poddaje całonocnemu suszeniu, po którym ochładza się je w eksykatorze, a następnie waży i określa suchą masę osobnika (najlepiej w gramach z dokładnością co najmniej do czwartego miejsca po przecinku).

51. Oprócz całkowitej suchej masy można określić suchą masę bez popiołu, zgodnie z pozycją bibliograficzną (49), aby uwzględnić elementy nieorganiczne pochodzące ze spożytego osadu obecnego w przewodzie pokarmowym osobników.

52. Biomasę określa się jako całkowitą biomasę na kontrpróbę obejmującą osobniki dorosłe i młode. Martwych osobników nie uwzględnia się przy określaniu biomasy na kontrpróbę.

Weryfikacja stężeń badanej substancji chemicznej

Pobieranie próbek

53. Próbki badanej substancji chemicznej przeznaczone do analizy chemicznej należy pobrać co najmniej w najwyższym i najniższym stężeniu, co najmniej na koniec etapu ustalenia stanu równowagi (przed dodaniem organizmów użytych do badania) oraz na koniec badania. Do analizy należy pobrać co najmniej całą objętość osadu i wody nadosadowej. Należy pobrać co najmniej dwie próbki na matrycę i zabieg w każdym dniu pobierania próbek. Jedną z dwóch próbek można przechowywać jako rezerwę (do analizy np. w przypadku gdy wstępna analiza wykracza poza zakres ± 20 % od stężenia nominalnego). W przypadku szczególnych właściwości

▼M6

chemicznych, np. jeżeli spodziewana jest szybka degradacja badanej substancji chemicznej, można dopracować schemat analityczny (np. zwiększyć częstotliwość pobierania próbek, poddać analizie więcej poziomów stężeń) na podstawie swojej najlepszej wiedzy. Próbki można wówczas pobierać w dni pośredniego pobierania próbek (np. siódmego dnia od rozpoczęcia narażenia).

54. Wodę nadosadową należy pobrać, ostrożnie ją dekantując lub syfonując, aby zminimalizować zakłócenia osadu. Należy odnotować objętość próbek.

55. Po usunięciu wody nadosadowej osad należy poddać homogenizacji i przenieść do odpowiedniego pojemnika. Należy odnotować masę próbki mokrego osadu.

56. Jeżeli dodatkowo wymagana jest analiza badanej substancji chemicznej w wodzie porowej, zważone próbki osadu poddane homogenizacji należy odwirować, aby otrzymać wodę porową. Na przykład około 200 ml mokrego osadu można przelać do 250 ml zlewek do odwirowywania. Następnie próbki należy odwirować bez filtrowania w celu wyodrębnienia wody porowej, np. na poziomie 10 000 ± 600 × *g* przez 30–60 min w temperaturze nieprzekraczającej temperatury stosowanej w badaniu. Po odwirowaniu supernatant dekantuje się lub wprowadza się go za pomocą pipety, uważając, aby nie zassać żadnych cząstek osadu, oraz odnotowuje się jego objętość. Odnotowuje się masę pozostałego osadu. Może to ułatwić oszacowanie bilansu masy lub odzysku badanej substancji chemicznej w układzie woda-osad, jeżeli suchą masę osadu określa się w każdym dniu pobierania próbek. W niektórych przypadkach analiza stężeń w wodzie porowej może być uniemożliwiona ze względu na zbyt małą próbkę.

57. Jeżeli analiza nie zostanie wykonana bezzwłocznie, wszystkie próbki należy przechowywać w odpowiedni sposób, np. zgodnie z warunkami dotyczącymi przechowywania, zalecanymi w celu zminimalizowania degradacji określonej badanej substancji chemicznej (np. próbki środowiskowe zwykle przechowuje się w temperaturze – 18 °C bez dostępu światła). Przed rozpoczęciem badania należy uzyskać informacje na temat właściwych warunków przechowywania określonej badanej substancji chemicznej – np. okresu trwania i temperatury przechowywania, procedur ekstrakcji itd.

Metoda analityczna

58. Ze względu na to, że cała procedura uzależniona jest zasadniczo od dokładności, precyzji i czułości metody analitycznej wykorzystywanej w odniesieniu do badanej substancji chemicznej, należy sprawdzić doświadczalnie, czy precyzja oraz odtwarzalność analizy chemicznej, a także odzyskiwanie badanej substancji chemicznej z wody i z próbek osadu, są zadowalające w przypadku danej metody co najmniej na poziomie najniższego i najwyższego badanego stężenia. Należy także sprawdzić, czy badana substancja chemiczna nie jest wykrywalna w komorach z próbą kontrolną w stężeniach wyższych niż granica oznaczalności. W razie potrzeby należy skorygować stężenie nominalne w odniesieniu do odzysku dobrej jakości substancji użytych do wzbogacenia prób kontrolnych (np. w przypadku gdy odzysk nie mieści się w przedziale 80–120 % wzbogaconej ilości). Przez cały okres trwania badania ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się w taki sposób, aby zminimalizować ich zanieczyszczenie i straty (np. wynikające z adsorpcji badanej substancji chemicznej na przyrządzie do pobierania próbek).

59. Odzysk badanej substancji chemicznej, granica oznaczalności i granica wykrywalności w osadzie i wodzie powinny być odnotowane i zgłoszone.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

60. Biomasa i całkowita liczba osobników na kontrpróbę stanowią główne obowiązkowe zmienne zależne badania, które należy ocenić pod względem statystycznym. Ocenie można również poddać, nieobowiązkowo, rozrodczość (jako wzrost liczby osobników) oraz wzrost (jako zwiększenie suchej biomasy). W takim przypadku szacowaną suchą masę osobników w momencie rozpoczęcia narażenia należy otrzymać np. z pomiarów suchej masy typowej podpróbki partii zsynchronizowanych organizmów użytych w badaniu.

▼M6

61. Chociaż śmiertelność nie stanowi punktu końcowego tego badania, należy w miarę możliwości poddać ją ocenie. Aby oszacować skalę śmiertelności, szereg osobników, które nie reagują na delikatne bodźce mechaniczne lub wykazują widoczne oznaki rozkładu, oraz brakujące osobniki należy uznać za martwe. Śmiertelność należy przynajmniej odnotować i uwzględnić przy interpretacji wyników badania.

62. Stężenia powodujące zmiany należy wyrażać w mg/kg suchej masy osadu. Jeżeli odzysk badanej substancji chemicznej mierzonej w osadzie lub osadzie i wodzie nadosadowej w momencie rozpoczęcia narażenia wynosi 80–120 % stężenia nominalnego, stężenia powodujące zmiany (EC_x, NOEC, LOEC) można wyrazić w oparciu o stężenia nominalne. Jeżeli odzysk odbiega od stężeń nominalnych o więcej niż ± 20 % wartości stężeń nominalnych, stężenia powodujące zmiany (EC_x, NOEC, LOEC) powinny opierać się na stężeniach zmierzonych na początku narażenia, np. z uwzględnieniem bilansu masy badanej substancji chemicznej w układzie badawczym (zob. pkt 30). W takich przypadkach dodatkowe informacje można otrzymać dzięki analizie roztworu podstawowego lub zastosowanych roztworów, aby potwierdzić, że badane osady przygotowano poprawnie.

EC_x

63. Wartości EC_x w odniesieniu do parametrów określonych w pkt 60 oblicza się za pomocą odpowiednich metod statystycznych (np. analizy probitowej, krzywej logistycznej, funkcji Weibulla, metody Spearmana-Kärbera lub prostej interpolacji). Wytyczne dotyczące oceny statystycznej znajdują się w pozycjach bibliograficznych (15) i (50). EC_x otrzymuje się, wstawiając wartość odpowiadającą x % średniej grupy kontrolnej do wybranego równania. Aby obliczyć EC_{50} lub każdą inną wartość EC_x, należy przeprowadzić analizę regresyjną średnich ($\overline{X}$) z okresu przed wprowadzeniem substancji chemicznej.

NOEC/LOEC

64. Jeżeli analiza statystyczna ma na celu wyznaczenie NOEC/LOEC, niezbędne są dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyń (poszczególne naczynia uznaje się za kontrpróby). Należy zastosować odpowiednie metody statystyczne. Ogólnie rzecz biorąc, niekorzystne skutki podania badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną bada się, stosując test jednostronnej (mniejszej) hipotezy na poziomie $p \leq 0,05$. Przykłady znajdują się w kolejnych punktach. Wytyczne dotyczące wyboru odpowiednich metod statystycznych określono w pozycjach bibliograficznych (15) i (50).

65. Normalny rozkład danych można zbadać np. za pomocą testu zgodności Kołmogrowa-Smirnowa, testu stosunku zakresu do standardowego odchylenia (test R/s) lub testu Shapiro-Wilka (dwustronny, $p \leq 0,05$). W badaniu jednorodności wariancji można zastosować test Cochrana, test Levene'a lub test Bartletta (dwustronny, $p \leq 0,05$). Jeżeli warunki metod parametrycznych badania (normalność, jednorodność wariancji) są spełnione, można wykonać jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) i kolejne testy wielokrotnego porównywania. Testy porównywania par (np. test t Dunnetta) lub testy regresyjne (test Williamsa) mogą być stosowane w celu obliczenia, czy istnieje znacząca różnica ($p \leq 0,05$) między próbami kontrolnymi a różnymi stężeniami badanej jednostki. W przeciwnym razie NOEC i LOEC należy określić za pomocą metod nieparametrycznych (np. za pomocą korekty Bonferroniego zgodnie z testem trendu Holma lub Jonckheere'a-Terpstry).

Badanie graniczne

66. Jeżeli przeprowadzono badanie graniczne (porównanie próby kontrolnej z jedną tylko próbą poddaną zabiegowi) i spełnione zostały warunki wstępne dotyczące parametrycznych procedur badania (normalność, jednorodność), odpowiedzi metryczne (całkowita liczba osobników oraz biomasa jako sucha masa osobników) można ocenić za pomocą testu t-Studenta. Jeżeli warunki te nie zostały spełnione, można zastosować test t-Studenta (test t-Welcha) dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, taki jak test Manna-Whitneya. Informacje dotyczące mocy statystycznej zebrane podczas testowania hipotezy w badaniu międzylaboratoryjnym metody znajdują się w dodatku 6.

▼M6

67. Aby określić znaczące różnice między próbami kontrolnymi (próbą kontrolną i próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem), można wykonać badanie kontrprób każdej próby kontrolnej zgodnie z opisem dotyczącym badania granicznego. Jeżeli w wyniku tych badań nie zostaną wykryte znaczące różnice, wszystkie próby kontrolne i kontrpróby kontrolne z rozpuszczalnikiem mogą być połączone. W przeciwnym wypadku wszystkie zabiegi należy porównać z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem.

Interpretacja wyników

68. Wyniki badania należy interpretować ostrożnie, jeżeli miały miejsce odstępstwa od tej metody badawczej oraz w przypadku gdy mierzone stężenia badanych roztworów występują na poziomach zbliżonych do granicy wykrywalności stosowanej metody analitycznej. Należy zwrócić uwagę na wszelkie odstępstwa od opisywanej metody badawczej.

Sprawozdanie z badania

69. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

— *Badana substancja chemiczna:*

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej (nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna, wzór strukturalny, numer CAS itp.), w tym czystość i metodę analityczną określania ilościowego badanej substancji chemicznej; źródło badanej substancji chemicznej, nazwę i stężenie wszelkich zastosowanych rozpuszczalników;

— wszelkie dostępne informacje dotyczące właściwości fizycznych i właściwości fizykochemicznych, uzyskane przed rozpoczęciem badania (np. rozpuszczalność w wodzie, prężność pary, współczynnik podziału w glebie (lub w osadzie, jeśli jest dostępny), log K_{ow}, stabilność w wodzie itd.).

— *Badany gatunek:*

— nazwa systematyczna, źródło, wszelkie przypadki obróbki wstępnej, aklimatyzacja, warunki hodowli itp.

— *Warunki badania:*

— zastosowana procedura badawcza (np. statyczna, półstatyczna lub przepływowa);

— projekt badania (np. liczba, materiał i wielkość komór badawczych, objętość wody na każde naczynie, masę i objętość osadu na każde naczynie, (w przypadku procedury przepływowej i półstatycznej: tempo wymiany objętości wody), napowietrzanie zastosowane przed badaniem i podczas badania, liczba kontrprób, liczba osobników w każdej kontrpróbie w momencie rozpoczęcia narażenia, liczba badanych stężeń, czas trwania etapu kondycjonowania, osiąganie równowagi i narażenia, częstotliwość pobierania próbek);

— głębokość warstwy osadu i warstwy wody nadosadowej;

— metoda wstępnej obróbki i wzbogacania/wprowadzenia badanej substancji chemicznej;

— badane stężenia nominalne, szczegóły dotyczące pobierania próbek do analizy chemicznej oraz metody analityczne, dzięki którym otrzymano stężenia badanej substancji chemicznej;

— charakterystyka osadu, zgodnie z pkt 24–25, oraz wszelkie inne wykonane pomiary;

— przygotowanie wody badawczej (jeśli stosowana jest woda regenerowana) i jej charakterystyka (stężenie tlenu, pH, przewodność właściwa, twardość i wszelkie inne wykonane pomiary) przed rozpoczęciem badania;

— szczegółowe informacje o karmieniu, w tym rodzaj pokarmu, przygotowanie, schemat żywienia i ilość pokarmu;

▼M6

— natężenie światła i fotoperiod(-y);

— metody stosowane w celu określenia wszystkich parametrów biologicznych (np. pobieranie próbek, kontrola, ważenie organizmów użytych do badania) i wszystkich parametrów abiotycznych (np. parametry jakości wody i osadu);

— objętość lub waga wszystkich próbek do analizy chemicznej;

— szczegółowe informacje na temat opracowania wszystkich próbek przeznaczonych do analizy chemicznej, w tym szczegółowe informacje na temat procedur przygotowania, przechowywania, wzbogacania, ekstrakcji oraz procedur analitycznych (oraz precyzji) zastosowanych w odniesieniu do badanej substancji chemicznej oraz odzysk badanej substancji chemicznej.

— *Wyniki:*

— jakość wody w naczyniach badawczych, (pH, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, twardość, stężenia amoniaku i wszelkie inne wykonane pomiary);

— zawartość całkowitego węgla organicznego (TOC), stosunek suchej masy do mokrej masy, pH osadu i wszelkie inne wykonane pomiary;

— całkowita liczba osobników oraz, jeżeli ustalono, liczba kompletnych i niekompletnych osobników w każdej komorze badawczej na końcu badania;

— sucha masa osobników w każdej komorze badawczej na końcu badania oraz, jeżeli zmierzono, sucha masa podpróbki osobników na początku badania;

— wszelkie zaobserwowane nietypowe zachowania w porównaniu z próbami kontrolnymi (np. unikanie osadu, obecność lub brak odchodów);

— wszelkie zaobserwowane przypadki śmiertelności;

— oszacowanie toksycznych punktów końcowych (np. EC_x, NOEC lub LOEC) oraz metody statystyczne użyte w celu ich określenia;

— badane stężenia nominalne, zmierzone badane stężenia i wyniki wszystkich analiz ustalających stężenie badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych;

— wszelkie odstępstwa od kryteriów ważności.

— *Ocena wyników*

— zgodność wyników z kryteriami ważności wymienionymi w pkt 13;

— omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

(1) Komisja Europejska (2003). Dokument ze wskazówkami technicznymi uzupełniający dyrektywę Komisji 93/67/EWG w sprawie oceny ryzyka ze strony substancji notyfikowanych, rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94 w sprawie oceny ryzyka stwarzanego przez istniejące substancje oraz dyrektywę 98/8/WE Parlamentu Europejskiego i Rady dotyczącą wprowadzania do obrotu produktów biobójczych; część I–IV. Urząd Publikacji Unii Europejskiej (Komisja Europejska), Luksemburg.

(2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD), Paryż.

▼**M6**

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. W: 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. W: 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) Rozdział C.27 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności w układzie osad-woda na ochotkowatych z wykorzystaniem wzbogaconego osadu.

(7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Wydanie 2. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 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. grudzień 1997 r.

(9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (red.), 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 listopada 1993 r., Renesse (NL).

(10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. M. Streloke i H.Köpp (red.). Berlin 1995.

(11) Riedhammer C. i B. Schwarz-Schulz (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. Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów. 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. We współpracy z R. Nagelem i B. Karaoglanem. 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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 23.

(15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; piąty projekt, marzec 2003 r.; 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. s. 205–215. W J.C. Eaton, P.R. Parrish i A.C. Hendricks (red.). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów.

▼**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. Toxicol. Chem. 12(7):1261-1266.

(21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps i G.T. Ankley (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. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2 196-2 202.

(25) Leppänen, M.T. i Kukkonen, J.V.K. (1998b). 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. W: A. Mudroch, J.M. Azcue i P. Mudroch (red.): 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., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann i R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, t. 20, s. 2000–2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski i R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. Na zlecenie Federalnej Agencji Ochrony Środowiska (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, marzec 2000 r.

▼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 M. Munawar (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 (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. nr 22.

(37) Rozdział C.1 niniejszego załącznika, Ryby, badanie toksyczności ostrej.

(38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paryż.

(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., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel i B. Streit. (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, Niemcy. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) 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.

(43) Naylor, C. i C. Rodrigues. (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. & 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. Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 54, OECD, Paryż, Francja.

(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 marca 2004 r. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblencja, Niemcy, s. 107–119.

Dodatkowe pozycje dotyczące procedur statystycznych:

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 (wydanie 3), s. 19–76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, Londyn.

Hamilton M.A., R.C. Russo i R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714–719; sprostowanie: 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 F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principle and practice of statistics in biological research. Wydanie 2. W.H. Freeman and Company. Nowy Jork.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. Nowy Jork.

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

Dodatek 1

Definicje

Dla celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Okres kondycjonowania stosuje się w celu ustabilizowania komponentu mikrobiologicznego osadu i usunięcia np. amoniaku pochodzącego z komponentów osadu; odbywa się przed wzbogaceniem osadu badaną substancją chemiczną. Zwykle woda nadosadowa jest usuwana po kondycjonowaniu.

EC_x jest stężeniem badanej substancji chemicznej w osadzie mającym x % wpływu (np. 50 %) na właściwości biologiczne w danym okresie narażenia.

Okres wyrównania stężeń stosuje się w celu rozprowadzenia badanej substancji chemicznej między fazą stałą, wodą porową i wodą nadosadową; odbywa się po wzbogaceniu osadu badaną substancją chemiczną i przed dodaniem organizmów użytych do badania.

Etap narażenia to czas, w trakcie którego organizmy użyte do badania poddaje się narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej.

Osad preparowany lub odtworzony, sztuczny lub syntetyczny stanowi mieszaninę materiałów używaną do symulowania składników fizycznych naturalnego osadu.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC) jest to najmniejsze badane stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym obserwuje się znaczące działanie toksyczne (przy $p \leq 0,05$) w porównaniu z próba kontrolną. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC muszą oddziaływać w równym lub większym stopniu niż te, które są obserwowane przy LOEC. Jeżeli te dwa warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób ustalono LOEC (a następnie NOEC).

Stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) jest stężeniem badanym bezpośrednio poniżej LOEC, które w porównaniu z próbą kontrolną nie ma statystycznie istotnego skutku ($p \leq 0,05$) w danym okresie narażenia.

Współczynnik podziału oktanol-woda (K_{ow}; czasem wyrażany również jako P_{ow}) to stosunek rozpuszczalności substancji chemicznej w n-oktanolu i wodzie w warunkach równowagi, odzwierciedlający lipofilność substancji chemicznej (rozdział A.24 niniejszego załącznika). K_{ow} lub jego logarytm K_{ow} (log K_{ow}) wykorzystuje się jako wskaźnik zdolności substancji chemicznej do bioakumulacji w organizmach wodnych.

Współczynnik podziału węgiel organiczny-woda (K_{oc}) to stosunek stężenia substancji chemicznej w/na frakcji węgla organicznego osadu i stężenia substancji chemicznej w wodzie w warunkach równowagi.

Woda nadosadowa jest to woda pokrywająca osad w naczyniu badawczym.

Woda porowa jest to woda wypełniająca przestrzeń między cząstkami osadu i gleby.

Osad wzbogacony jest to osad, do którego dodano substancję chemiczną.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼**M6**

Dodatek 2

Skład zalecanej wody regenerowanej

(w rozumieniu rozdziału C.1 niniejszego załącznika (1))

a) *Roztwór chlorku wapnia*

Rozpuścić 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ w wodzie dejonizowanej, dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.

b) *Roztwór siarczanu magnezu*

Rozpuścić 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ w wodzie dejonizowanej, dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.

c) *Roztwór wodorowęglanu sodu*

Rozpuścić 2,59 g $NaHCO_3$ w wodzie dejonizowanej, dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.

d) *Roztwór chlorku potasu*

Rozpuścić 0,23 g KCl w wodzie dejonizowanej, dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.

Wszystkie substancje chemiczne muszą być czyste do analizy.

Przewodność właściwa wody destylowanej lub dejonizowanej nie powinna przekraczać 10 μScm^{-1}.

Należy wymieszać 25 ml każdego z roztworów a)–d) i dopełnić całkowitą objętość wodą dejonizowaną do 1 l. Suma jonów wapnia i magnezu w tych roztworach wynosi 2,5 mmol/l.

Stosunek jonów Ca:Mg wynosi 4:1, a jonów Na:K wynosi 10:1. Pojemność kwasowa $K_{S4.3}$ w tym roztworze wynosi 0,8 mmol/l.

Wodę rozcieńczającą należy poddać aeracji do osiągnięcia nasycenia tlenem, a następnie przechowywać ją przez około dwa dni bez dalszego napowietrzania przed zastosowaniem.

BIBLIOGRAFIA

1) Rozdział C.1 niniejszego załącznika, Ryby, badanie toksyczności ostrej.

▼**M6**

Dodatek 3

Właściwości fizykochemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej

Składnik	Stężenia
Cząstki stałe	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 µg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 µg/l
Chlor resztkowy	< 10 µg/l
Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych	< 50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l
(dostosowano za OECD (1992)(1))	

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paryż.

▼M6

Dodatek 4

Zalecany osad sztuczny – wytyczne w zakresie przygotowania i przechowywania

Składniki osadu

Składnik	Właściwości	% suchej masy osadu
Torf	Torf sfagnowy o „średnim” stopniu rozkładu, suszony na powietrzu, bez widocznych pozostałości roślin, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 0,5 mm)	5 ± 0,5
Piasek kwarcowy	Wielkość ziaren: ≤ 2 mm, ale > 50 % cząstek powinna mieścić się w przedziale 50–200 μm	75–76
Glinka kaolinowa	Zawartość kaolinitu ≥ 30 %	20 ± 1
Źródło pokarmu	Np. sproszkowana pokrzywa (Folia urticae), liście Urtica dioica (pokrzywy zwyczajnej), drobno zmielone (wielkość cząstek ≤ 0,5 mm) zgodna z farmaceutycznymi standardami dotyczącymi spożycia przez ludzi; jako dodatek do suchego osadu	0,4–0,5 %
Węgiel organiczny	Korygowany przez dodanie torfu i piasku	2 ± 0,5
Węglan wapnia	$CaCO_3$, sproszkowany, chemicznie czysty, jako dodatek do suchego osadu	0,05–1
Woda dejonizowana	Przewodność właściwa ≤ 10 μS/cm, jako dodatek do suchego osadu	30–50

Uwaga: Jeżeli przewiduje się podwyższone stężenia amoniaku, np. jeżeli wiadomo, że badana substancja chemiczna hamuje nitryfikację, użyteczne może być zastąpienie 50 % bogatej w azot sproszkowanej pokrzywy celulozą (np. chemicznie czystym proszkiem z alfa-celulozy, wielkość cząsteczek ≤ 0,5 mm; (1) (2)).

Przygotowanie

Torf suszy się na powietrzu i mieli na drobny proszek. Zawiesinę wymaganej ilości proszku torfowego w wodzie dejonizowanej przygotowuje się za pomocą wysokosprawnego urządzenia do homogenizacji. Wartość pH zawiesiny koryguje się do poziomu 5,5 ± 0,5, stosując $CaCO_3$. W celu ustabilizowania pH i komponentu mikrobiologicznego zawiesinę kondycjonuje się przez co najmniej dwa dni w temperaturze 20 ± 2 °C, delikatnie mieszając. Ponownie mierzy się pH, którego wartość powinna wynosić 6,0 ± 0,5. Następnie zawiesinę torfową miesza się z innymi składnikami (piaskiem i glinką kaolinową) oraz wodą dejonizowaną, aby otrzymać jednorodny osad o zawartości wody wynoszącej 30-50 % suchej masy osadu. Ponownie mierzy się wartość pH końcowej mieszaniny i koryguje w razie potrzeby za pomocą $CaCO_3$ do poziomu 6,5–7,5. Jeżeli jednak przewiduje się powstawanie amoniaku, przydatne może okazać się utrzymywanie pH w osadzie poniżej 7,0 (np. w zakresie 6,0–6,5). Próbki osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość węgla organicznego. Jeżeli przewiduje się powstawanie amoniaku, możliwe jest kondycjonowanie osadu preparowanego przez siedem dni w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania (np. stosunek osad-woda 1: 4, wysokość warstwy osadu jak w naczyniach badawczych) przed wzbogaceniem go badaną substancją chemiczną, tj. należy uzupełnić go wodą, która powinna zostać napowietrzona. Na koniec okresu kondycjonowania należy usunąć i odrzucić wodę nadosadową.

▼M6

Następnie wzbogacony piasek kwarcowy miesza się z osadem na każdym poziomie zabiegu, osad rozdziela się do naczyń badawczych do kontrprób i uzupełnia wodą do badania. Naczynia są następnie inkubowane w takich samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania. W tym momencie rozpoczyna się okres wyrównywania stężeń. Warstwa wody nadosadowej powinna być napowietrzona.

Wybrane źródło pokarmu należy dodać przed wzbogaceniem osadu badaną substancją chemiczną lub w jego trakcie. Może ona zostać zmieszana z zawiesiną torfową (zob. powyżej). Nadmiernego rozkładu źródła pokarmu przed dodaniem organizmów użytych do badań, np. w przypadku długiego okresu wyrównywania stężeń, można jednak uniknąć, zachowując jak najkrótszy okres między dodaniem pokarmu i rozpoczęciem narażenia. W celu zapewnienia wystarczającego wzbogacenia pokarmu badaną substancją chemiczną, źródło pokarmu należy wymieszać z osadem nie później niż w dniu wzbogacenia osadu badaną substancją chemiczną.

Przechowywanie

Suche składniki sztucznego osadu mogą być przechowywane w suchym i chłodnym miejscu lub w temperaturze pokojowej. Przygotowany osad wzbogacony badaną substancją chemiczną należy niezwłocznie użyć do badania. Próbki wzbogaconego osadu można, do czasu ich analizy, przechowywać w warunkach zalecanych w odniesieniu do danej badanej substancji chemicznej.

BIBLIOGRAFIA

(1) 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. We współpracy z R. Nagelem i B. Karaoglanem. 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. 24–25 marca 2004 r. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblencja, Niemcy, s. 107–119.

▼M6

Dodatek 5

Metody hodowli Lumbriculus variegatus

Gatunek *Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta zamieszkuje osady słodkich wód i jest powszechnie wykorzystywany w badaniach ekotoksykologicznych. Jego hodowla w warunkach laboratoryjnych jest łatwa. Poniżej podano ogólny opis metod hodowli.

Metody hodowli

Warunki hodowli w przypadku *Lumbriculus variegatus* zostały szczegółowo przedstawione w Phippsa i in. (1993) (1), Brunson i in. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Poniżej przedstawione zostało krótkie streszczenie tych warunków. Główną zaletę *L. variegatus* stanowi jego szybkie rozmnażanie się, skutkujące szybko rosnącą biomasą w populacjach hodowanych w laboratoriach (np. (1), (3), (4), (5)).

Osobniki można hodować w dużych akwariach (57–80 l) w temperaturze 23 °C przy fotoperiodzie wynoszącym 16L:8D (100–1 000 luksów), stosując codzienne odnawianą naturalną wodę (45–50 l na akwarium). Podłoże przygotowuje się poprzez pocięcie niebielonych brązowych papierowych ręczników na paski, które można następnie na kilka sekund wymieszać z wodą do hodowli, aby wytworzyć małe kawałki papierowego podłoża. Podłoża można następnie użyć bezpośrednio w akwariach do hodowli *Lumbriculus*, pokrywając dno zbiornika, lub przechowywać zamrożone w dejonizowanej wodzie do późniejszego wykorzystania. Nowe podłoże w zbiorniku zasadniczo zachowa trwałość przez około dwa miesiące.

Każdą hodowlę rozpoczyna się od 500–1 000 organizmów karmionych 10 ml zawiesiny zawierającej 6 g pokarmu przeznaczonego dla młodych pstrągów 3 razy w tygodniu w warunkach wymiany lub przepływu. W przypadku hodowli statycznych lub pół-statycznych dostarczane porcje pożywienia powinny być mniejsze, aby zapobiec rozwojowi bakterii i grzybów.

W tych warunkach liczba osobników w hodowli zasadniczo ulega podwojeniu w ciągu 10–14 dni.

Lumbriculus variegatus można ewentualnie hodować w systemach składających się z warstwy piasku kwarcowego, takiego jakiego używa się do sztucznego osadu (1–2 cm głębokości), i wody regenerowanej. Jako naczynia do hodowli wykorzystać można pojemniki wykonane ze szkła lub stali nierdzewnej o wysokości 12 do 20 cm. Zbiornik z wodą należy delikatnie napowietrzać (np. 2 pęcherzyki powietrza na sekundę) przez pipetę Pasteura umieszczoną około 2 cm powyżej powierzchni osadu. Aby zapobiec gromadzeniu się np. amoniaku, wodę nadosadową należy wymieniać, stosując układ przepływowy lub manualnie co najmniej raz w tygodniu. Skąposzczety mogą być trzymane w temperaturze pokojowej z fotoperiodem wynoszącym 16 godzin światła (o natężeniu 100–1 000 luksów) i 8 godzin bez dostępu światła. W przypadku hodowli pół-statycznych (wymiana wody raz na tydzień) osobniki karmione są karmą TetraMin dwa razy na tydzień (np. 0,6–0,8 mg na cm^2 powierzchni osadu), która może być podawana w formie zawiesiny 50 mg TetraMinu na 1 ml wody dejonizowanej.

Lumbriculus variegatus można usuwać z hodowli, np. przesiewając podłoże na siatce o małych oczkach lub wyjmując organizmy za pomocą pipety o szerokim wylocie (około 5 mm średnicy) z krawędzią nadtopioną nad ogniem i przenosząc do oddzielnej zlewki. Jeżeli do zlewki zostało również przeniesione podłoże, zlewkę zawierającą organizmy i podłoże pozostawia się na noc w warunkach przepływu, co pozwala usunąć podłoże ze zlewki, natomiast organizmy pozostaną na dnie naczynia. Można je następnie wprowadzić do nowo przygotowanych zbiorników do hodowli lub poddać dalszej obróbce na potrzeby badania jak przedstawiono w (3) i (4) lub w dalszej części opisu.

Kwestią, do której należy podejść krytycznie w przypadku zastosowania *L. variegatus* w badaniach bioakumulacji osadu, jest sposób rozmnażania tego gatunku (architomia lub morfalaksja, np. (6)). Wynikiem takiego bezpłciowego rozmnażania są dwa fragmenty, które nie pobierają pokarmu przez pewien okres do momentu regeneracji części głowy lub ogona (np. (7)(8)). Oznacza to, że w przypadku *L. variegatus* pobieranie zanieczyszczonego osadu nie odbywa się w sposób ciągły.

▼M6

W związku z tym w celu zminimalizowania niekontrolowanego rozmnażania i regeneracji oraz późniejszej dużej zmienności w wynikach badań, należy dokonać synchronizacji. Zmienność taka może mieć miejsce w przypadku gdy niektóre osobniki, które uległy fragmentacji i w związku z tym nie pobierają pokarmu przez pewien okres, są w mniejszym stopniu narażone na działanie badanej substancji niż inne osobniki, które nie uległy fragmentacji podczas badania, np. (9), (10), (11). Na 10–14 dni przed rozpoczęciem narażenia organizmy należy sztucznie podzielić (synchronizacja). W celu synchronizacji należy wybrać duże (dorosłe) osobniki, które nie wykazują oznak niedawnej morfalaksji. Organizmy te można umieścić na szklanym szkiełku w kropli wody do hodowli i rozciąć w okolicy środkowej części ciała za pomocą skalpela. Należy dopilnować, aby tylne końce były podobnej długości. Tylne końce należy następnie pozostawić w celu odtworzenia nowych głów w naczyniu do hodowli zawierającym to samo podłoże, co wykorzystane w hodowli, i wodę regenerowaną aż do momentu rozpoczęcia narażenia. Oznaką regeneracji nowych głów jest zakopywanie się zsynchronizowanych organizmów w substracie (obecność zregenerowanych głów można potwierdzić, sprawdzając reprezentatywne podróbki pod dwu-okularowym mikroskopem). Przewiduje się, że organizmy użyte do badań będą potem w podobnym stanie fizjologicznym. Oznacza to, że jeśli podczas badania następuje rozmnażanie przez morfalaksję w przypadku zsynchronizowanych organizmów, praktycznie wszystkie zwierzęta będą w równym stopniu narażone na wzbogacony osad. Pierwsze karmienie zsynchronizowanych organizmów powinno zostać wykonane w momencie, gdy organizmy zaczną zakopywać się w podłożu lub 7 dni po rozcięciu. Schemat żywienia powinien wyglądać podobnie jak w przypadku zwykłych hodowli, ale zaleca się karmienie zsynchronizowanych organizmów tym samym źródłem pożywienia, które ma być wykorzystane w badaniu. Organizmy należy przechowywać w temperaturze badania wynoszącej 20 ± 2 °C. Po regeneracji w badaniu zastosować należy nienaruszone i kompletne osobniki, które pod wpływem delikatnych bodźców mechanicznych aktywnie pływają lub pełzają. Należy zapobiegać zranieniom lub autotomii organizmów, np. stosując do ich przenoszenia pipety z krawędziami nadtopionymi nad ogniem lub narzędzia stomatologiczne ze stali nierdzewnej.

Źródła kultur starterowych Lumbriculus variegatus (adresy w Stanach Zjednoczonych podane za (4))

Europa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2–14
D-65439 Flörsheim/Main
Niemcy

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Niemcy

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finlandia

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Niemcy

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

STANY ZJEDNOCZONE AMERYKI

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

BIBLIOGRAFIA

(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. W: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Wydanie 2. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marzec 2000 r.

(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 (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. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2 196-2 202.

(8) Leppänen, M.T. i Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183–194.

(9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann i R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, t. 20, s. 2000–2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski i R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. Na zlecenie Federalnej Agencji Ochrony Środowiska (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, marzec 2000 r.

(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

Dodatek 6

Podsumowanie wyników badań międzylaboratoryjnych

„Badanie toksyczności osadu przy wykorzystaniu *Lumbriculus variegatus*"

Tabela 1

Wyniki poszczególnych serii badań międzylaboratoryjnych: średnia liczba organizmów w próbach kontrolnych i w próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem na koniec badania; SD = odchylenie standardowe; CV = współczynnik zmienności

	Średnia liczba organizmów w próbach kontrolnych	SD	CV (%)	n	Średnia liczba organizmów w próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem	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
Średnia z badań międzylaboratoryjnych	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
min	**16,3**				**15,0**			
maks	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

▼M6

Tabela 2

Wyniki poszczególnych serii badań międzylaboratoryjnych: średnia całkowita sucha masa organizmów w kontrpróbie w próbach kontrolnych i w próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem na koniec badania; SD = odchylenie standardowe; CV = współczynnik zmienności

	Całkowita sucha masa organizmów w kontrpróbie (próbach kontrolnych)	SD	CV (%)	n	Całkowita sucha masa organizmów w kontrpróbie (w próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem)	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
Średnia z badań międzylaboratoryjnych	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
min	**12,9**				**10,5**			
maks	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

Tabela 3

Toksyczność PCP: podsumowanie punktów końcowych w badaniu międzylaboratoryjnym; średnia z badań międzylaboratoryjnych dla EC_{50}, NOEC i LOEC; SD = odchylenie standardowe; CV = współczynnik zmienności

Parametr biologiczny		Średnia z badań międzylaboratoryjnych (mg/kg)	min	maks	Współczynnik wyników badań międzylaboratoryjnych (mg/kg)	SD	CV (%)	średnia geometryczna (mg/kg)å
całkowita liczba organizmów	**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				
całkowita sucha masa organizmów	**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				
śmiertelność/ przeżycie	**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
rozmnażanie (wzrost liczby organizmów w kontrpróbie)	**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				
wzrost (wzrost biomasy na kontrpróbę)	**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 wykrywalna różnica w odniesieniu do wartości prób kontrolnych podczas testowania hipotez; stosowana jako miara mocy statystycznej

BIBLIOGRAFIA

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. We współpracy z R. Nagelem i B. Karaoglanem. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼M6

C.36. BADANIE ROZRODCZOŚCI DRAPIEŻNYCH ROZTOCZY (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) W GLEBIE

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 226 (2008). Niniejsza metoda badawcza ma na celu dokonanie oceny wpływu działania substancji chemicznych w glebie na zdolność rozrodczą gatunków roztoczy glebowych *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), a zatem pozwala na oszacowanie zahamowania tempa wzrostu danej populacji (1,2). Zdolność rozrodcza oznacza w tym wypadku liczbę młodych osobników pod koniec okresu badania. *H. aculeifer* reprezentuje dodatkowy poziom troficzny gatunków, w odniesieniu do których dostępne są już metody badawcze. Za odpowiednie do celów niniejszej metody badawczej uważa się badanie rozrodczości bez wykluczania i określania ilościowego na poszczególnych etapach cykli reprodukcyjnych. W odniesieniu do substancji chemicznych przy których stosuje się inny scenariusz narażenia niż narażenie poprzez glebę stosowne mogą być również inne podejścia (3).

2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* uważa się za odpowiedniego przedstawiciela fauny glebowej, a w szczególności – drapieżnych roztoczy. Osobniki tego gatunku występują na całym świecie (5), można je łatwo zebrać i hodować w laboratorium. Podsumowanie biologii *H. aculeifer* przedstawiono w dodatku 7. Dostępne są podstawowe informacje dotyczące ekologii gatunków roztoczy i ich zastosowania w badaniach ekotoskykologicznych (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

ZASADA BADANIA

3. Dorosłe samice narażane są na działanie szeregu stężeń substancji chemicznej wymieszanej z glebą. Badanie rozpoczyna się na 10 dorosłych samicach przypadających na jedno naczynie z kontrpróbą. Samców nie wprowadza się do badania, gdyż jak wykazało doświadczenie, w przypadku obecności samców samice rozpoczynają rozmnażanie niezwłocznie po wyjściu ze stadium poczwarki lub niewiele później. Ponadto włączenie samców do badania przedłużyłoby przedmiotowe badanie, gdyż niezbędne stałoby się trudne do wykonania wykluczenie pewnych etapów rozwoju. Samo rozmnażanie nie stanowi zatem części badania. Samice wprowadza się do badania 28–35 dni po rozpoczęciu okresu składania jaj w synchronizacji (zob. dodatek 4), gdyż można wtedy uznać, że już zostały skojarzone z samcami, a więc przeszły etap poprzedzający etap składania jaj. W temperaturze 20 °C badanie kończy się 14. dnia po wprowadzeniu samic (dzień 0), dzięki czemu pierwsze potomstwo w próbie kontrolnej osiągnie stadium poczwarki (zob. dodatek 4). Jako główną mierzoną wartość określa się liczbę młodych osobników na naczynie badawcze i dodatkowo liczbę samic, które przeżyły. Zdolność rozrodczą roztoczy narażonych na badaną substancję chemiczną porównuje się ze zdolnością w próbach kontrolnych w celu określenia ECx (np. EC10, EC50) lub najwyższego stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) (zob. definicje w dodatku 1), w zależności od projektu badania (zob. pkt 29). Ogólny zarys harmonogramu badania przedstawiono w dodatku 8.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

4. W miarę możliwości należy znać rozpuszczalność w wodzie, log K_{ow}, współczynnik podziału gleba/woda oraz prężność pary badanej substancji chemicznej. Pożądane są dodatkowe informacje na temat losów badanej substancji chemicznej w glebie, takie jak wskaźniki rozkładu biotycznego i abiotycznego.

5. Niniejszą metodę badawczą można stosować w odniesieniu do substancji chemicznych rozpuszczalnych albo nierozpuszczalnych w wodzie. Sposób zastosowania badanej substancji chemicznej będzie się jednak odpowiednio różnił. Metoda badawcza nie ma zastosowania do lotnych substancji chemicznych, np. substancji chemicznych, w odniesieniu do których stała Henry'ego lub współczynnik podziału powietrze/woda są większe niż jeden, lub substancji chemicznych, w odniesieniu do których prężność pary przekracza 0,0133 Pa w temperaturze 25 °C.

▼M6

WAŻNOŚĆ BADANIA

6. Aby wynik badania był ważny, powinny być spełnione następujące kryteria dotyczące prób kontrolnych niepoddanych działaniu substancji:

— średnia śmiertelność dorosłych samic osiągnięta na koniec badania nie powinna przekraczać 20 %;

— średnia liczba osobników młodych w każdej kontrpróbie (do której wprowadzono 10 dorosłych samic) na koniec badania powinna wynosić co najmniej 50;

— współczynnik zmienności obliczony w odniesieniu do liczby młodych osobników roztoczy w każdej kontrpróbie nie powinien być wyższy niż 30 % na koniec ostatecznego badania.

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

7. Należy określić ECx lub NOEC substancji chemicznej odniesienia, aby zapewnić odpowiednie warunki badania w laboratorium i sprawdzić, czy reakcja organizmów użytych do badania nie zmieniła się w czasie. Odpowiednią substancją chemiczną odniesienia, w przypadku której wykazano wpływ na rozmiar populacji, jest dimetoat (CAS 60-51-5) (4). Jako alternatywnej substancji chemicznej odniesienia można użyć kwasu borowego (CAS 10043-35-3). W przypadku tej substancji chemicznej uzyskano mniejsze doświadczenie. Możliwe są dwa warianty projektów:

— substancję chemiczną odniesienia można badać równolegle z oznaczaniem toksyczności każdej badanej substancji chemicznej o jednym stężeniu, co należy uprzednio wykazać w badaniu dawka-odpowiedź, którego wynik wyniesie > 50 % zmniejszenia liczby potomstwa. W tym wypadku liczba kontrprób powinna być taka sama jak liczba prób kontrolnych (zob. pkt 29);

— ewentualnie substancję chemiczną odniesienia bada się 1–2 razy do roku, stosując badanie dawka-odpowiedź. W zależności od wybranego wariantu liczba stężeń i kontrprób oraz współczynnik rozstawienia stężeń są zróżnicowane (zob. pkt 29), powinno się jednak osiągnąć wynik w zakresie 10–90 % odpowiedzi (przy współczynniku rozstawienia stężeń równym 1,8). W przypadku dimetoatu EC_{50} określone na podstawie liczby młodych osobników powinno spaść do zakresu 3,0–7,0 mg substancji aktywnej/kg gleby (suchej masy). Opierając się na uzyskanych dotychczas wynikach dotyczących kwasu borowego, EC50 określone na podstawie liczbie młodych osobników powinno spaść do zakresu 100–500 mg/kg suchej masy gleby.

OPIS BADANIA

Naczynia i wyposażenie używane do badania

8. Należy używać naczyń badawczych o średnicy 3–5 cm (grubość warstwy gleby ≥ 1,5 cm), wykonanych ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału i wyposażonych w dokładnie dopasowaną pokrywkę. Preferowane są pokrywki zakręcane, w którym to wypadku naczynia mogłyby być napowietrzane dwa razy na tydzień. Można ewentualnie używać osłon (np. gaza), umożliwiających bezpośrednią wymianę gazową między podłożem a atmosferą. W związku z tym, że podczas badania należy zachować wystarczająco wysoką wilgotność, istotne jest, aby w trakcie trwania badania kontrolować wagę każdego naczynia badawczego i w razie potrzeby uzupełniać wodę. Może być to szczególnie istotne, jeżeli niedostępne są pokrywki zakręcane. Jeżeli używa się nieprzezroczystego naczynia badawczego, osłona powinna być wykonana z materiału, który umożliwia dostęp światła (np. perforowana, przezroczysta osłona), jednocześnie uniemożliwiająca ucieczkę roztoczy. Wielkość i rodzaj naczynia badawczego zależy od metody ekstrakcji (szczegółowe informacje można znaleźć w dodatku 5). Jeżeli stosuje się ekstrakcję ciepłem doprowadzanym do naczynia badawczego, należy wyposażyć je w dno w postaci siatki o odpowiednich rozmiarach oczek (szczelnie zamknięte do momentu ekstrakcji), natomiast głębokość warstwy gleby powinna być na tyle duża, aby uwzględnić gradient temperatury i wilgotności.

▼M6

9. Wymagane jest standardowe wyposażenie laboratorium, obejmujące w szczególności:

— naczynia, najlepiej wykonane ze szkła, z zakręcanymi pokrywami;

— suszarka szafkowa;

— mikroskop stereoskopowy;

— szczotki do przenoszenia roztoczy;

— pehametr i luksomierz;

— odpowiednie dokładne wagi;

— odpowiedni sprzęt do regulacji temperatury;

— odpowiedni sprzęt do regulacji wilgotności powietrza (nie jest konieczny, jeżeli naczynia narażone na działanie substancji są przykryte pokrywkami);

— inkubator lub małe pomieszczenie z regulacją temperatury;

— sprzęt do przeprowadzania ekstrakcji (zob. dodatek 5) (13).

— górny panel świetlny z regulacją światła;

— słoje do zbierania wydobytych roztoczy.

Przygotowanie sztucznej gleby

10. W niniejszym badaniu stosuje się sztuczną glebę. Sztuczna gleba składa się z następujących składników (wszystkie wartości dotyczą suchej masy):

— 5 % torfu sfagnowego, suszonego na powietrzu i drobno zmielonego (dopuszczalna wielkość cząstek 2 ± 1 mm);

— 20 % glinki kaolinowej (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);

— około 74 % przemysłowego piasku suszonego na powietrzu (w zależności od potrzebnej ilości $CaCO_3$), głównie drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek ma wymiary 50–200 mikronów. Dokładna ilość piasku zależy od zawartości $CaCO_3$ (zob. poniżej), razem powinny stanowić 75 %.

— < 1,0 % węglanu wapnia ($CaCO_3$, sproszkowanego, czystego do analizy), aby otrzymać pH 6,0 ± 0,5; ilość dodawanego węglanu wapnia może zależeć przede wszystkim od jakości/charakteru torfu (zob. uwaga 1).

Uwaga 1: Ilość potrzebnego $CaCO_3$ będzie zależna od składników podłoża gleby i należy ją oznaczyć, dokonując bezpośrednio przed badaniem pomiaru pH podpróbek gleby (14).

Uwaga 2: Zawartość torfu w sztucznej glebie odbiega od zawartości stosowanej w innych metodach badawczych dotyczących organizmów glebowych, gdzie w większości przypadków stosuje się 10 % zawartości torfu (np. (15)). Według EPPO (16) w typowej glebie rolnej znajduje się nie więcej niż 5 % materii organicznej, zmniejszenie zawartości torfu odzwierciedla zatem mniejsze możliwości naturalnej gleby do sorpcji badanej substancji chemicznej do węgla organicznego.

Uwaga 3: W razie potrzeby, np. do celów związanych z konkretnymi badaniami, za podłoże do badań lub hodowli mogą również służyć naturalne gleby z niezanieczyszczonych obszarów. Jeżeli jednak używa się gleby naturalnej, należy określić co najmniej jej pochodzenie (miejsce pobrania), pH, teksturę (rozkład wielkości cząstek) oraz zawartość związków organicznych. Należy podać rodzaj i nazwę gleby zgodnie

▼M6

z klasyfikacją gleb, jeżeli są one dostępne, a sama gleba nie powinna być zanieczyszczona. W przypadku gdy badana substancja chemiczna jest metalem lub związkiem metaloorganicznym, należy również określić pojemność wymiany kationów (PWK). Ponieważ podstawowe informacje na temat gleb naturalnych są zazwyczaj trudne do uzyskania, należy zwrócić szczególna uwagę na zachowanie kryteriów ważności.

11. Suche składniki gleby dokładnie miesza się (np. w dużym mieszalniku laboratoryjnym). W celu określenia pH stosuje się mieszaninę gleby i 1-molowego roztworu chlorku potasu (KCl) lub 0,01-molowego roztworu chlorku wapnia ($CaCl_2$) w stosunku 1:5 (zob. (14) i dodatek 3). Jeżeli kwasowość gleby przekracza wymagany zakres (zob. pkt 10), można ją dostosować, dodając odpowiednią ilość $CaCO_3$. Jeżeli gleba jest zbyt alkaliczna, można to skorygować, dodając większą ilość mieszaniny zawierającej pierwsze trzy ze składników określonych w pkt 10 z wyłączeniem $CaCO_3$.

12. Maksymalną pojemność wodną sztucznej gleby ustala się zgodnie z procedurami określonymi w dodatku 2. Na dwa do siedmiu dni przed rozpoczęciem badania suchą sztuczną glebę nawilża się wstępnie, dodając odpowiednią ilość wody destylowanej lub dejonizowanej, w celu uzyskania około połowy końcowej zawartości wody, stanowiącej 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby. Zawartość wilgoci dostosowuje się, aby osiągnąć 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby, dodając roztwór badanej substancji chemicznej lub wodę destylowaną albo dejonizowaną (zob. pkt 16-18). Należy wykonać dodatkową przybliżoną ocenę zawartości wilgoci w glebie, ściskając glebę delikatnie w dłoni – jeżeli zawartość wilgoci jest odpowiednia, pomiędzy palcami powinny pojawić się małe krople wody.

13. Zawartość wilgoci w glebie określa się na początku i na końcu badania, susząc do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C zgodnie z normą ISO 11465 (17), zaś pH gleby określa się zgodnie z dodatkiem 3 lub normą ISO 10390 (14). Pomiary te powinno się przeprowadzać w dodatkowych próbkach niezawierających roztoczy, zarówno na glebie pobranej z próby kontrolnej, jak i na glebie pobranej z każdego badania stężenia. Nie należy korygować pH gleby podczas badania kwasowych substancji chemicznych lub podstawowych chemikaliów. Podczas badania powinno się monitorować zawartość wilgoci, co jakiś czas ważąc naczynia (zob. pkt 20 i 24).

Wybór i przygotowanie zwierząt użytych do badania

14. Gatunkiem wykorzystywanym w badaniu jest *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Do rozpoczęcia badania potrzebne są dorosłe samice roztoczy pochodzące ze zsynchronizowanej kohorty. Roztocza powinno się wprowadzić do badania ok. 7–14 dni od momentu osiągnięcia przez nie dojrzałości, 28–35 dni po rozpoczęciu składania jaj w synchronizacji (zob. pkt 3 i dodatek 4). Należy odnotować źródło pochodzenia roztoczy lub ich dostawcę, a także utrzymanie hodowli laboratoryjnej. W przypadku prowadzenia hodowli laboratoryjnej zaleca się, aby co najmniej raz do roku potwierdzać identyfikację gatunku. Formularz identyfikacji stanowi dodatek 6.

Przygotowywanie badanych stężeń

15. Badaną substancję chemiczną miesza się z glebą. Rozpuszczalniki organiczne zastosowane w celu wspomagania podawania badanej substancji chemicznej do gleby należy wybrać na podstawie niskiej toksyczności dla roztoczy; projekt badania musi zawierać właściwą próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem (zob. pkt 29).

Badana substancja chemiczna rozpuszczalna w wodzie

16. Roztwór badanej substancji chemicznej przygotowuje się w wodzie dejonizowanej w ilości wystarczającej do wszystkich kontrprób w ramach jednego badanego stężenia. Zaleca się zastosowanie odpowiedniej ilości wody, aby osiągnąć wymaganą wilgotność, tj. 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby (zob. pkt 12). Przed wprowadzeniem do naczynia badawczego każdy roztwór badanej substancji chemicznej dokładnie miesza się z jedną partią wstępnie nawilżonej gleby.

▼M6

Badana substancja chemiczna nierozpuszczalna w wodzie

17. W przypadku substancji chemicznych nierozpuszczalnych w wodzie, ale rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych, badaną substancję chemiczną można rozpuścić w jak najmniejszej ilości odpowiedniego nośnika (np. acetonu). Należy stosować jedynie lotne rozpuszczalniki. W przypadku stosowania takich nośników wszystkie badane stężenia i próba kontrolna powinny zawierać tę samą minimalną ilość nośnika. Nośnik natryskuje się na niewielką ilość, na przykład 10 g, drobnego piasku kwarcowego albo miesza się go z piaskiem. Należy uwzględnić tę ilość przy ustalaniu całkowitej zawartości piasku w podłożu. Nośnik usuwa się, odparowując go przez co najmniej godzinę pod okapem wyciągowym. Tę mieszaninę piasku kwarcowego i badanej substancji chemicznej dodaje się do wstępnie nawilżonej gleby i dokładnie miesza, dodając odpowiednią ilość dejonizowanej wody w celu otrzymania wymaganej wilgoci. Otrzymaną mieszaninę umieszcza się w naczyniach badawczych. Należy zauważyć, że niektóre rozpuszczalniki mogą być toksyczne dla roztoczy. Zaleca się zatem zastosowanie dodatkowej próby kontrolnej z wodą bez nośnika, jeżeli toksyczność rozpuszczalnika względem roztoczy nie jest znana. Jeżeli zostanie odpowiednio udowodnione, że rozpuszczalnik (w stężeniach, które mają być zastosowane) nie wywołuje żadnych skutków, można wyeliminować grupę kontrolną z wodą.

Badana substancja chemiczna słabo rozpuszczalna w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych

18. W przypadku substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie oraz w rozpuszczalnikach organicznych ekwiwalent 2,5 g drobno zmielonego piasku kwarcowego na jedno naczynie badawcze (na przykład 10 g drobnego piasku kwarcowego na cztery kontrpróby) miesza się z daną ilością badanej substancji chemicznej w celu otrzymania pożądanego badanego stężenia. Należy uwzględnić tę ilość przy ustalaniu całkowitej zawartości piasku w podłożu. Tę mieszaninę piasku kwarcowego i badanej substancji chemicznej dodaje się do wstępnie nawilżonej gleby i dokładnie miesza po dodaniu odpowiedniej ilości dejonizowanej wody w celu otrzymania wymaganej zawartości wilgoci. Otrzymaną mieszaninę przekłada się do naczyń badawczych. Procedurę tę powtarza się dla każdego badanego stężenia, a także przygotowuje się odpowiednią próbę kontrolną.

PROCEDURA

Grupy badane i kontrolne

19. W przypadku każdej próby kontrolnej i każdego naczynia zabiegowego zaleca się umieszczanie 10 dorosłych samic w 20 g suchej masy sztucznej gleby. Organizmy używane do badania powinno się dodać w przeciągu dwóch godzin po przygotowaniu końcowego podłoża używanego w badaniu (tj. po zastosowaniu badanej jednostki). W szczególnych przypadkach (np. gdy starzenie uznaje się za decydujący czynnik) czas pomiędzy przygotowaniem końcowego podłoża używanego w badaniu a dodaniem roztoczy może zostać przedłużony (szczegółowe informacje dotyczące starzenia można znaleźć w (18)). W takich wypadkach należy jednak przedstawić naukowe uzasadnienie.

20. Po dodaniu roztoczy do gleby zapewnia się im pokarm i należy również określić wagę początkową każdego naczynia badawczego, aby podczas badania można było ją wykorzystać jako wartość referencyjną do celów monitorowania zawartości wilgoci w glebie, jak określono w pkt 24. Naczynia badawcze następnie przykrywa się zgodnie z opisem w pkt 8 i umieszcza w komorze badawczej.

21. Dla każdej metody wprowadzenia badanej substancji chemicznej opisanej w pkt 15–18 przygotowuje się odpowiednie próby kontrolne. Podczas przygotowywania prób kontrolnych postępuje się zgodnie z odpowiednimi opisanymi procedurami, z tym, że nie dodaje się badanej substancji chemicznej. W związku z tym w stosownych przypadkach do prób kontrolnych wprowadza się rozpuszczalniki organiczne, piasek kwarcowy lub inne nośniki, w takich samych stężeniach/ilościach, które zastosowano podczas zabiegów. W przypadku dodania do badanej substancji chemicznej rozpuszczalnika lub innego nośnika należy również przygotować dodatkową próbę kontrolną bez nośnika lub badanej substancji chemicznej i zbadać ją, jeżeli toksyczność rozpuszczalnika nie jest znana (zob. pkt 17).

▼M6

Warunki badania

22. Temperatura badania powinna wynosić 20 ± 2 °C. Temperaturę należy odnotowywać co najmniej raz dziennie i w razie potrzeby należy ją korygować. Badanie przeprowadza się w warunkach kontrolowanych cykli dzień–noc (najlepiej 16 godzin światła i 8 godzin bez dostępu światła) z natężeniem światła w okolicy naczyń badawczych na poziomie 400–800 luksów. Ze względu na kwestie porównywalności warunki te są takie same, jak w innych badaniach ekotoksykologicznych gleby (np. (15)).

23. Należy zapewnić wymianę gazową, napowietrzając naczynia badawcze co najmniej dwa razy w tygodniu w przypadku stosowania pokryw przykręcanych. Jeżeli użyto osłon z gazy, należy zwrócić szczególną uwagę na utrzymanie zawartości wilgoci w glebie (zob. pkt 8 i 24).

24. W trakcie badania zawartość wody w podłożu glebowym w naczyniach badawczych utrzymuje się za pomocą okresowego (np. raz w tygodniu) ważenia i w razie potrzeby ponownego ważenia naczyń badawczych. W razie potrzeby straty uzupełnia się wodą dejonizowaną. Zawartość wilgoci podczas badania nie powinna różnić się od początkowej zawartości wilgoci o więcej niż 10 %.

Karmienie

25. Wykazano, że odpowiednie źródło pokarmu stanowią rozkruszki drobne (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781 r.)). Do tego celu mogą również nadawać się małe skoczogonki (np. młode osobniki *Folsomia candida* Willem, 1902, lub *Onychiurus fimatus* (19), (20), wazonkowce (np. *Enchytraeus crypticus* Westheide i Graefe, 1992) lub nicienie (np. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) (21). Zaleca się sprawdzenie pokarmu przed wykorzystaniem go w badaniu. Rodzaj i ilość pokarmu powinny zapewnić odpowiednią liczbę osobników młodych, aby wypełnić kryteria ważności (pkt 6). Aby wybrać pożywienie, należy uwzględnić sposób działania badanej jednostki (np. akarycydy mogą być toksyczne również dla roztoczy spożywczych, zob. pkt 26).

26. Pokarm należy dostarczać bez ograniczeń (tj. za każdym razem małe porcje (na końcówce szpatułki)). W tym celu można również zastosować wentylator wyciągowy o niskim ciśnieniu ssania proponowany w badaniu skoczogonków lub cienki pędzel. Zwykle wystarczy dostarczać pokarm na początku badania i dwa do trzech razy na tydzień. Jeżeli badana jednostka okaże się toksyczna dla podawanego pokarmu, należy rozważyć zwiększenie ilości pokarmu lub znalezienie alternatywnego źródła pokarmu.

Dobór badanych stężeń

27. W doborze odpowiednich badanych stężeń pomocna powinna być uprzednia znajomość toksyczności badanej substancji chemicznej np. z badań ustalających zakres. W stosownych przypadkach badanie ustalające zakres stężeń przeprowadza się, stosując pięć stężeń badanej substancji chemicznej w zakresie 0,1–1 000 mg/kg suchej gleby z co najmniej jedną kontrpróbą w odniesieniu do zabiegów i próby kontrolnej. Badanie ustalające zakres trwa 14 dni i po jego zakończeniu określa się śmiertelność dorosłych osobników roztoczy oraz liczbę osobników młodych. Wyboru zakresu stężenia w badaniu końcowym najlepiej dokonać tak, aby obejmował stężenia, przy których obserwuje się wpływ na liczbę osobników młodych, natomiast niemające wpływu na przeżywalność pokolenia matki. Może to jednak być niemożliwe w odniesieniu do substancji chemicznych mających letalny lub subletalny wpływ przy niemal podobnych stężeniach. Stężenie efektywne (np. EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) i zakres stężeń, powyżej którego skutki działania badanej substancji chemicznej stają się przedmiotem zainteresowania, należy umieścić między wartościami stężeń objętych badaniem. Ekstrapolowanie wyników znacznie poniżej najniższego stężenia, przy którym obserwuje się zmiany mające wpływ na organizmy użyte do badania, lub powyżej najwyższego badanego stężenia należy wykonać jedynie w wyjątkowych przypadkach, a w sprawozdaniu należy przedstawić pełne uzasadnienie.

Projekt doświadczenia

Badania dotyczące reakcji na dawkę

28. Proponowane są trzy projekty badania w oparciu o zalecenia wynikające z innego badania międzylaboratoryjnego (badanie dotyczące rozmnażania

▼M6

wazonkowców (22)). Ogólną przydatność wszystkich tych projektów potwierdził wynik weryfikacji *H. aculeifer*.

29. Przy ustalaniu zakresu stężeń należy wziąć pod uwagę, co następuje:

— w celu wyznaczenia EC_x (np. EC_{10}, EC_{50}) należy poddać badaniom dwanaście stężeń. Zaleca się co najmniej dwie kontrpróby dla każdego badanego stężenia oraz sześć kontrprób kontrolnych. Współczynnik rozstawienia stężeń może być zróżnicowany, tj. może być równy lub mniejszy niż 1,8 w oczekiwanym przedziale skutków oraz może przekraczać 1,8 przy wyższych i niższych stężeniach;

— w celu wyznaczenia NOEC należy zbadać co najmniej pięć stężeń uporządkowanych w szereg geometryczny. Zaleca się cztery kontrpróby dla każdego badanego stężenia i dodatkowo osiem prób kontrolnych. Kolejne stężenie nie powinno być większe niż 2,0-krotność poprzedniego;

— połączone podejście umożliwia wyznaczenie zarówno NOEC, jak i ECx. Należy zastosować osiem badanych stężeń uporządkowanych w szeregu geometrycznym. Zaleca się cztery kontrpróby dla każdego zabiegu i dodatkowo osiem prób kontrolnych. Kolejne stężenie nie powinno być większe niż 1,8-krotność poprzedniego;

Badanie graniczne

30. Jeżeli w badaniu ustalającym zakres stężeń w przypadku najwyższego stężenia (tj. 1 000 mg/kg suchej masy gleby) nie zaobserwowano żadnych efektów, jako badanie graniczne można przeprowadzić badanie rozrodczości, stosując badane stężenie 1 000 mg/kg suchej masy gleby. Badanie graniczne zapewni możliwość wykazania, że NOEC lub EC_{10} w przypadku rozrodczości jest wyższe niż stężenie graniczne, przy czym do badania używa się minimalnej liczby roztoczy. Należy zastosować osiem kontrprób zarówno w odniesieniu do gleby podanej zabiegowi, jak i próby kontrolnej.

Czas trwania badania i pomiary

31. Należy zarejestrować wszelkie zaobserwowane różnice występujące między zachowaniem i morfologią roztoczy w próbie kontrolnej i w naczyniu poddanemu zabiegowi.

32. W 14. dniu żywe roztocza wydobywa się z gleby za pomocą ekstrakcji ciepłem/światłem lub inną odpowiednią metodą (zob. dodatek 5). Młode (tj. larwy, protonimfy i poczwarki) i dorosłe osobniki liczy się oddzielnie. Dorosłe roztocza, których nie znaleziono na tym etapie, odnotowuje się jako martwe, zakładając, że takie roztocza padły i rozłożyły się przed oceną. Skuteczność ekstrakcji w próbach kontrolnych musi podlegać ocenie raz lub dwa razy w roku, przy czym liczba osobników dorosłych i młodych musi być znana. Średnia skuteczność wszystkich stadiów rozwojowych powinna być wyższa niż 90 % (zob. dodatek 5). Obliczenia dotyczące osobników dorosłych i młodych nie są korygowane pod kątem skuteczności.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

33. Informacje na temat metod statystycznych, które można wykorzystać do analizy wyników badania, znajdują się w pkt 36–41. Ponadto należy zapoznać się z dokumentem OECD nr 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application” (31).

34. Zdolność rozrodcza, czyli liczba młodych osobników wyprodukowanych w przeliczeniu na naczynie badawcze z kontrpróbą (z 10 wprowadzonymi dorosłymi samcami), stanowi główny punkt końcowy badania. Do celów

▼M6

analizy statystycznej dotyczącej zdolności rozrodczej wymagane jest obliczenie średniej arytmetycznej (X) oraz wariancji (s^2) w odniesieniu do zabiegu i próby kontrolnej. X i s^2 stosuje się w odniesieniu do procedur ANOVA, takich jak test t-Studenta, test Dunnetta lub test Williamsa, a także w celu obliczenia przedziałów ufności 95 %.

Uwaga: główny punkt końcowy jest równoważny z płodnością stanowiącą liczbę młodych osobników wyprodukowanych podczas badania, podzieloną przez liczbę rodzicielskich samic wprowadzonych na początku badania.

35. Liczba żywych samic w próbach kontrolnych, których nie poddano działaniu substancji, stanowi główne kryterium ważności i musi być udokumentowana. Podobnie jak w przypadku badania ustalającego zakres, wszystkie pozostałe objawy szkodliwości należy również zawrzeć w sprawozdaniu końcowym.

ECx

36. Wartości ECx, w tym powiązane z nimi górne i dolne granice ufności na poziomie 95 % w odniesieniu do parametru określonego w pkt 34, oblicza się za pomocą odpowiednich metod statystycznych (np. analizy probitowej, krzywej logistycznej, funkcji Weibulla, metody Spearmana-Kärbera lub prostej interpolacji). EC_x otrzymuje się, wstawiając wartość odpowiadającą x % średniej grupy kontrolnej do wybranego równania. Aby obliczyć EC_{50} lub dowolną inną wartość EC_x, należy zastosować analizę regresji w odniesieniu do średnich z poszczególnych zabiegów (X).

NOEC/LOEC

37. Jeżeli analiza statystyczna ma na celu wyznaczenie NOEC/LOEC, niezbędne są dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyń (poszczególne naczynia uznaje się za kontrpróby). Należy stosować odpowiednie metody statystyczne (zgodnie z dokumentem OECD nr 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application"). Ogólnie rzecz biorąc, niekorzystne skutki podania badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną bada się, stosując test jednostronnej (mniejszej) hipotezy na poziomie $p \leq 0,05$. Przykłady znajdują się w kolejnych punktach.

38. Normalny rozkład danych można zbadać np. za pomocą testu zgodności Kołmogrowa-Smirnowa, testu stosunku zakresu do standardowego odchylenia (test R/s) lub testu Shapiro-Wilka (dwustronny, $p \leq 0,05$). W badaniu jednorodności wariancji można zastosować test Cochrana, test Levene'a lub test Bartletta (dwustronny, $p \leq 0,05$). Jeżeli warunki metod parametrycznych badania (normalność, jednorodność wariancji) są spełnione, można wykonać jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) i kolejne testy wielokrotnego porównywania. Testy wielokrotnego porównywania (np. test t Dunnetta) lub testy regresyjne (test Williamsa w przypadku monotonnej zależności dawka-odpowiedź) mogą być stosowane w celu obliczenia, czy istnieje znacząca różnica ($p \leq 0,05$) między próbami kontrolnymi a różnymi stężeniami badanej jednostki (wybór zalecanego testu zgodny z dokumentem OECD nr 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application"). W przeciwnym razie NOEC i LOEC należy określić za pomocą metod nieparametrycznych (np. za pomocą korekty Bonferroniego zgodnie z testem trendu Holma lub Jonckheere'a-Terpstry).

Badanie graniczne

39. Jeżeli przeprowadzono badanie graniczne (porównanie próby kontrolnej z jedną tylko próbą poddaną zabiegowi) i spełniono warunki wstępne dotyczące parametrycznych procedur badania (normalność, jednorodność), odpowiedzi metryczne można ocenić za pomocą testu t-Studenta. Jeżeli warunki te nie zostały spełnione, można zastosować test t-Studenta (test t-Welcha) dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, taki jak test Manna-Whitneya.

40. Aby określić znaczące różnice między próbami kontrolnymi (próbą kontrolną i próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem), można wykonać badanie kontrprób każdej próby kontrolnej zgodnie z opisem dotyczącym badania

▼M6

granicznego. Jeżeli w wyniku tych badań nie zostaną wykryte znaczące różnice, wszystkie próby kontrolne i kontrpróby kontrolne z rozpuszczalnikiem mogą być połączone. W przeciwnym wypadku wszystkie zabiegi należy porównać z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem.

Sprawozdanie z badania

41. Sprawozdanie z badania powinno zawierać co najmniej następujące informacje:

— *Badana substancja chemiczna*

— nazwa badanej substancji chemicznej, nazwa systematyczna, partia, seria i numer CAS, stopień czystości;

— właściwości fizykochemiczne badanej substancji (np. log K_{ow}, rozpuszczalność w wodzie, prężność pary, stała Henry'ego (H) i najlepiej informacje o losach badanej substancji chemicznej w glebie).

— *Organizmy użyte do badania*

— identyfikacja gatunku i dostawców organizmów użytych do badania, opis warunków hodowli;

— przedział wiekowy organizmów użytych do badania.

— *Warunki badania*

— opis projektu doświadczenia i procedury;

— szczegóły przygotowania gleby do badania; szczegółową specyfikację, jeżeli używa się naturalnej gleby (pochodzenie, historia, rozkład wielkości cząstek, pH, zawartość związków organicznych oraz klasyfikacja gleby, jeżeli jest dostępna);

— maksymalna pojemność wodna gleby;

— opis techniki stosowanej do wprowadzenia badanej substancji chemicznej do gleby;

— szczegółowe dane dotyczące pomocniczych substancji chemicznych użytych w celu podania badanej substancji chemicznej;

— rozmiar naczyń badawczych i sucha masa badanej gleby na naczynie;

— natężenie światła, czas trwania cykli światło–brak światła, temperatura;

— opis schematu żywienia, rodzaj i ilość pokarmu używanego w badaniu, terminy karmienia;

— pH i zawartość wody w glebie na początku i w trakcie badania (próba kontrolna i każda próba poddana zabiegowi);

— szczegółowy opis metody ekstrakcji i skuteczności ekstrakcji.

— *Wyniki badania:*

— liczba osobników młodych oznaczonych w naczyniu badawczym na końcu badania;

— liczba dorosłych samic i śmiertelność dorosłych osobników (%) w każdym naczyniu badawczym na końcu badania;

— opis wyraźnych symptomów fizjologicznych lub widocznych zmian w zachowaniu;

— wyniki otrzymane z wykorzystaniem badanej substancji chemicznej odniesienia;

— statystyki podsumowujące (ECx lub NOEC) w tym granice ufności na poziomie 95 % oraz opis metody obliczania;

▼**M6**

— wykres zależności stężenie–odpowiedź;

— odchylenia od procedur opisanych w niniejszej metodzie badawczej oraz wszelkie nietypowe zdarzenia, jakie miały miejsce podczas badania.

BIBLIOGRAFIA

(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. Wydanie 2. W: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, s. 523.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the popua-lation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). W: F. Dusbabek i V. Bukva (red.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, Haga, tom 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: s. 241–249.

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: s 621–628.

(8) Krogh, P.H. i Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. W: Lokke, H. i van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, s. 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. W: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebroook, P.W., Van Straalen, N.M. i Tarazona, J.V. (red.). SETAC Press, Pensacola, Stany Zjednoczone. 128 s.

(10) Schlosser, H.-J. i Riepert, F. (1991/92). 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 (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1994). Soil Quality – Determination of pH, nr 10390. ISO, Genewa.

▼**M6**

(15) Rozdział C.8 niniejszego załącznika, Toksyczność dla dżdżownic.

(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 (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1993). Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, nr 11465. ISO, Genewa.

(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, Stany Zjednoczone.

(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) Rozdział C.32 niniejszego załącznika – Badanie rozrodczości wazonkowcowatych.

(23) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1994). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, nr 11268-2 ISO, Genewa. ISO, Genewa.

(24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (wydanie 2.). Chapman & Hall, Londyn, s. 524.

(25) Dunger, W. i Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (wydanie 2.). G. Fischer, Jena, s. 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 (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 54. ENV/JM/MONO(2006)18.

▼M6

Dodatek 1

Definicje

Do niniejszej metody badawczej mają zastosowanie następujące definicje (w tym badaniu wszystkie stężenia powodujące zmiany wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby):

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian) oznacza stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym nie obserwuje się żadnych szkodliwych zmian. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające NOEC nie ma statystycznie istotnego skutku ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia, jeżeli porówna się je z próbą kontrolną.

LOEC (najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany) oznacza najniższe stężenie badanej substancji chemicznej mające statystycznie istotny skutek ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną.

EC_x (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływu na organizmy użyte do badania w danym okresie narażenia, w porównaniu z próbą kontrolną. Na przykład EC_{50} jest stężeniem, które w przybliżeniu ma wpływ na punkt końcowy badania w 50 % narażonej populacji w określonym okresie narażenia.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M6

Dodatek 2

Określenie maksymalnej pojemności wodnej gleby

Jak wykazano, do określania maksymalnej pojemności wodnej gleby (WHC) odpowiednia jest poniższa metoda. Została ona opisana w załączniku C do normy ISO DIS 11268-2 (Jakość gleby – wpływ zanieczyszczeń na dżdżownice (*Eisenia fetida*)). Część 2: Oznaczanie wpływu na rozmnażanie (23)).

Pobrać do badania określoną ilość (np. 5 g) gleby z podłoża za pomocą odpowiedniego przyrządu (wybieraka ślimakowego itp.). Przykryć dno wybieraka mokrym kawałkiem bibuły filtracyjnej, a następnie umieść wybierak na stelażu w łaźni wodnej. Wybierak należy stopniowo zanurzać aż do momentu, gdy poziom wody znajdzie się powyżej powierzchni gleby. Następnie należy zostawić go w wodzie na około trzy godziny. Ponieważ nie cała woda wchłonięta przez kapilary w glebie może zostać zatrzymana, należy umieścić wybierak na podłożu z wilgotnego drobno zmielonego piasku kwarcowego umieszczonego w przykrytym naczyniu (aby zapobiec wysychaniu) na dwie godziny w celu odsączenia próbki gleby. Próbkę należy następnie zważyć, wysuszyć do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C. Pojemność wodną gleby (WHC) można następnie obliczyć w następujący sposób:

$$\text{WHC (w\% suchej masy)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

gdzie:

S = podłoże nasycone wodą + masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej

T = tara (masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej)

D = sucha masa podłoża

▼**M6**

Dodatek 3

Określenie pH gleby

Podana poniżej metoda określania pH gleby opiera się na opisie zawartym w normie ISO DIS 10390: Jakość gleby – Oznaczanie pH (16).

Określoną ilość gleby suszy się w temperaturze pokojowej przez co najmniej 12 godzin. Następnie sporządzana jest zawiesina gleby (zawierająca co najmniej 5 gramów gleby) w 1-molowym roztworze chlorku potasu czystego do analizy (KCl) lub 0,01-molowym roztworze chlorku wapnia czystego do analizy ($CaCl_2$) o objętości pięciokrotnie większej od objętości gleby. Otrzymaną zawiesinę dokładnie wymieszać, wstrząsając przez pięć minut, a następnie odstawić do osadzenia się na co najmniej 2 godziny, ale nie na dłużej niż 24 godziny. W fazie ciekłej pH jest mierzone za pomocą pehametru, który jest kalibrowany przed każdym pomiarem przy użyciu odpowiedniego szeregu roztworów buforowych (np. pH 4,0 i 7,0).

▼M6

Dodatek 4

Hodowla *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, roztoczy spożywczych oraz synchronizacja hodowli

Hodowla Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer:

Hodowle mogą być prowadzone w naczyniach z tworzywa sztucznego lub w szklanych słojach wypełnionych gipsem modelarskim / mieszaniną proszku węglowego (9:1). Gips można zwilżać, dodając, w razie potrzeby, kilka kropel wody destylowanej lub dejonizowanej. Optymalne temperatury do hodowli wahają się między 20 ± 2 °C, a cykl światło/bez dostępu światła nie jest istotny dla tego gatunku. Pożywienie mogą stanowić roztocza Typrophagus putrescentiae lub Caloglyphus sp. (z roztoczami spożywczymi należy postępować ostrożnie, ponieważ mogą powodować alergie u ludzi), ale nicienie, wazonkowce i skoczogonki również są odpowiednimi jednostkami pożywienia. Należy odnotowywać ich źródło. Rozwój populacji może rozpocząć się od jednej samicy, ponieważ samce rozwijają się w niezapłodnionych komórkach jajowych. Pokolenia w dużej mierze nakładają się na siebie. Samice mogą żyć co najmniej 100 dni i w tym czasie mogą złożyć około 100 jaj. Maksymalna liczba jaj składana jest między 10. a 40. dniem (po osiągnięciu dojrzałości) i wynosi 2,2 jaja na samicę$^{-1}$ na dzień$^{-1}$. Okres rozwoju od komórki jajowej do dorosłej samicy w temperaturze 20 °C wynosi około 20 dni. Należy z wyprzedzeniem prowadzić i utrzymywać więcej hodowli niż jedna.

Hodowla Typrophagus putrescentiae:

Roztocza hoduje się w szklanym naczyniu wypełnionym drobnym proszkiem z drożdży browarnianych, które umieszcza się w pojemniku z tworzywa sztucznego wypełnionym roztworem KNO_3, aby nie dopuścić do ucieczki roztoczy. Roztocza spożywcze umieszcza się na powierzchni proszku. Następnie ostrożnie miesza się je z proszkiem (który należy wymieniać dwa razy w tygodniu) za pomocą szpatułki.

Synchronizacja hodowli:

Próbki użyte w badaniu powinny być w podobnym wieku (około 7 dni po osiągnięciu dorosłego stadium). W temperaturze hodowli wynoszącej 20 °C jest to możliwe dzięki

przeniesieniu samic do czystych naczyń hodowlanych i podaniu odpowiedniej ilości pokarmu:

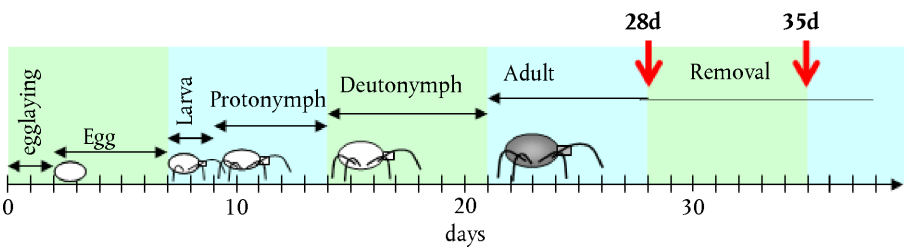
— umożliwić składanie jaj przez dwa do trzech dni, usunąć samice;

— poddać samice badaniu między 28. a 35. dniem po umieszczeniu dorosłych samic w czystych naczyniach hodowlanych.

Dorosłe samice można z łatwością odróżnić od samców i osobników w innych stadiach rozwoju dzięki większemu rozmiarowi, nabrzmiałemu kształtowi i brązowej tarczy grzbietowej (samce są mniejsze i płaskie), osobniki niedojrzałe są w barwie od białej do kremowej. Rozwój roztoczy w temperaturze 20 °C jest w przybliżeniu zgodny ze schematem opisanym poniżej (rysunek): komórka jajowa – 5d, larwa – 2d, protonimfa – 5d, poczwarka – 7d, okres przed składaniem jaj przez samicę – 2d Następnie roztocza osiągają dojrzałość.

Rysunek

Rozwój Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer w temperaturze 20 °C (usuwanie = samice użyte do badania)



▼**M6**

Dorosłe zwierzęta użyte do badań usuwa się z zsynchronizowanej hodowli i wprowadza do naczynia badawczego między 28. a 35. dniem po rozpoczęciu składania jaj przez rodzicielskie samice (tj. 7–14 dni po osiągnięciu przez nie dojrzałości). Stanowi to gwarancję, że zwierzęta użyte do badań przeszły przez okres poprzedzający składanie jaj i zostały skojarzone z samcami, które również są obecne w naczyniu do hodowli. Obserwacje hodowli laboratoryjnych wskazują, że w przypadku obecności samców samice rozpoczynają rozmnażanie niezwłocznie lub wkrótce po osiągnięciu dojrzałości (Ruf, Vaninnen, obserwacje własne). Okres siedmiu dni wybiera się, aby ułatwić integrację w procedurze laboratoryjnej oraz aby zmniejszyć indywidualne różnice w rozwoju występujące między roztoczami. Proces składania jaj należy rozpocząć z co najmniej taką samą liczbą samic, jaka jest ostatecznie niezbędna do wykonania badania (jeżeli np. 400 samic potrzeba do wykonania badania, co najmniej 400 samicom należy umożliwić składanie jej przez 2–3 dni). Co najmniej 1 200 jaj powinno stanowić punkt wyjścia dla zsynchronizowanej populacji (proporcja płci około 0,5, śmiertelność około 0,2). Aby uniknąć kanibalizmu, odpowiednie byłoby przechowywanie w jednym naczyniu nie więcej niż 20–30 samic składających jaja.

▼**M6**

Dodatek 5

Metody ekstrakcji

W przypadku mikro-stawonogów odpowiednią metodą na oddzielenie próbek od gleby/podłoża jest ekstrakcja ciepłem (zob. rysunek poniżej). Metoda ta opiera się na aktywności organizmów, więc odnotowane zostaną jedynie ruchome okazy. Zasadą ekstrakcji ciepłem jest zapewnienie organizmom stopniowo pogarszających się warunków w próbie, tak aby opuściły podłoże i wpadły w utrwalającą ciecz (np. etanol). Kluczowy punkt stanowi czas trwania ekstrakcji i gradient zmiany warunków dla organizmów z dobrych na średnie i złe. Czas trwania ekstrakcji w odniesieniu do badań ekotoksykologicznych musi być jak najkrótszy, ponieważ wszelki wzrost populacji podczas ekstrakcji zafałszowałby wyniki. Z drugiej strony temperatura i wilgoć w próbie zawsze muszą utrzymywać się na poziomie umożliwiającym roztoczom poruszanie się. Ogrzanie próbki gleby prowadzi do wyschnięcia podłoża. Jeżeli wysychanie następuje zbyt szybko, część roztoczy również może wyschnąć zanim zdąży uciec.

W związku z tym proponowana jest następująca procedura (24) (25):

Aparatura: lejek Tullgrena lub podobne metody, np. metoda McFadyena (ogrzewając z góry, próbę umieszcza się na lejku).

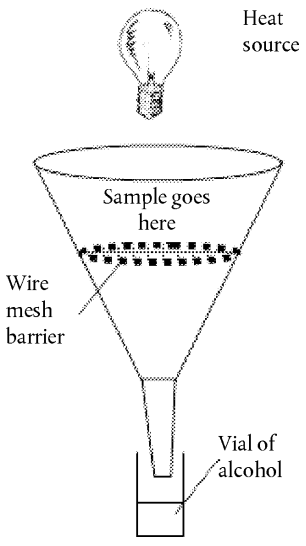
System ogrzewania: 25 °C przez 12 godzin, 35 °C przez 12 godzin, 45 °C przez 24 godziny (w sumie 48 godzin). Należy mierzyć temperaturę podłoża.

Ciecz utrwalająca: 70-procentowy etanol.

Szczegóły: Wziąć szklaną fiolkę użytą do badania. Zdjąć pokrywkę i owinąć otwór siatką lub tkaniną. Tkanina powinna mieć oczka wielkości 1,0–1,5 mm. Przymocować tkaninę elastyczną gumką. Ostrożnie odwrócić fiolkę do góry nogami i umieścić ją w aparaturze służącej do ekstrakcji. Tkanina chroni podłoże przed przedostaniem się do cieczy utrwalającej, ale umożliwia roztoczom opuszczenie próby. Po umieszczeniu w aparaturze wszystkich fiolek rozpocząć ogrzewanie. Zakończyć proces ekstrakcji po upływie 48 godzin. Usunąć utrwalone fiolki i policzyć roztocza za pomocą mikroskopu preparacyjnego.

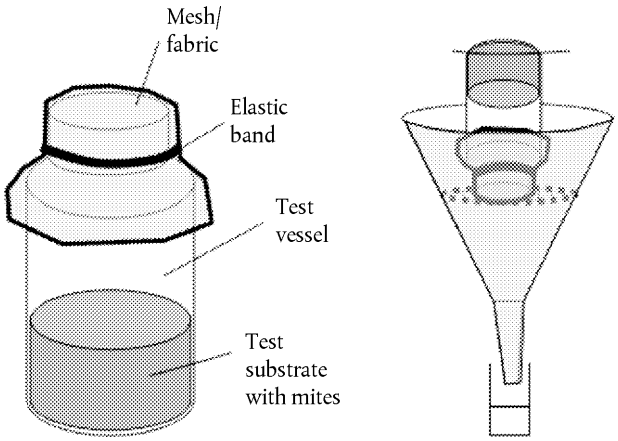
Skuteczności ekstrakcji w ramach wybranej metody należy dowodzić raz lub dwa razy w roku, stosując naczynia zawierające określoną liczbę młodych i dorosłych roztoczy przetrzymywanych w podłożu użytym w badaniu, niepoddanym działaniu substancji chemicznej. Średnia skuteczność wszystkich stadiów rozwojowych powinna wynosić ≥ 90 %.

Przyrząd do ekstrakcji (wersja aparatu Tullgrena)



▼**M6**

Sposób przygotowania fiolki do badania po zakończeniu badania, przed ekstrakcją



▼**M6**

Dodatek 6

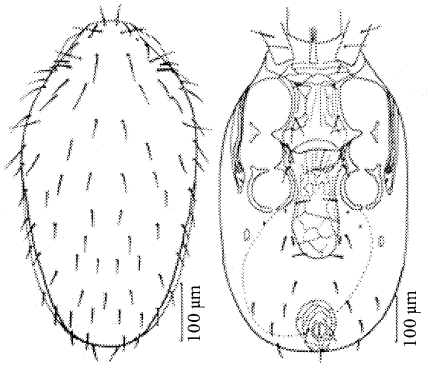
Identyfikacja Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer

Podgromada/rząd/podrząd:	Rodzina:	Rodzaj/podrodzaj/gatunek:
Roztocza/dręcze/żukowce	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

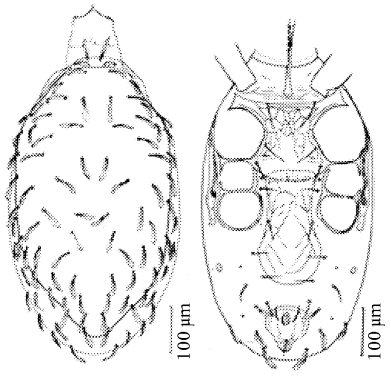
Autor i data:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 stycznia 2007 r.

Zastosowana bibliografia:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, wersja druga zmieniona: 1–523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministerstwo Rolnictwa, Rybołówstwa i Żywności, biuletyn techniczny 9: 400 s. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., s. 509

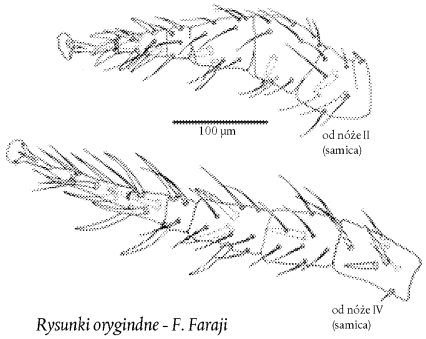
Cechy deterministyczne:	Okrywa o okrągłej, ząbkowanej krawędzi; hypostomowe rowki z co najmniej sześcioma ząbkami; niezbyt długie ogonowe i grzbietowe włoski Z4; zwykła tarcza płciowa, nieznacznie rozbudowana i niesięgająca tarczy odbytowej; tylna część tarczy grzbietowej ze sparowanym włosiem; odnóża II i IV z gęstym włosiem; włosie grzbietowe Z5 około dwóch razy dłuższe niż J5; stała liczba szczękoczułek z 12–14 zębami i zmienna liczba szczękoczułek z dwoma zębami; długość idiosomy 520–685 μm. *Hypoaspis miles* używa się również w biologicznych próbach kontrolnych i łatwo je pomylić z *H. aculeifer*. Główne różnice to: *H. miles* należą do podrodzaju *Cosmolaelaps* i posiadają włoski grzbietowe w kształcie noża, natomiast *H. aculeifer* należą do podrodzaju *Geolaelaps* i posiadają włoski grzbietowe przypominające sierść.



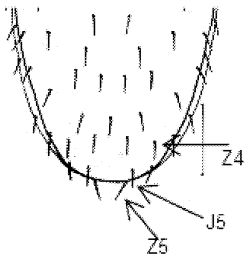
Hypoaspis aculeifer wg Hughes, 1976



Hypoaspis miles wg Hughes, 1976



Rysunki oryginalne - F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
tarcza grzbietowa z charakterystycznymi włoskami

▼M6

Dodatek 7

Podstawowe informacje dotyczące biologii *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer należy do rodziny *Lealapidae*, rzędu *Acari* (roztoczy), gromady pajęczaków, typu stawonogów. Żyje we wszystkich rodzajach gleb i żywi się innymi roztoczami, nicieniami, wazonkowcami i skoczogonkami (26). W przypadku braku pokarmu przechodzi na kanibalizm (27). Drapieżne roztocza składają się z segmentów, takich jak idiosoma i gnatosoma. Nie istnieje wyraźny podział idiosomy na głowotułów i odwłok. Gnatosoma (pancerz głowy) obejmuje narządy gębowe, takie jak nogogłaszczki i szczękoczułki. Szczękoczułki składają się z trzech segmentów i służą do walki, wyposażone są w zęby o różnym kształcie. Poza połykaniem samce używają szczękoczułek głównie do przekazywania spermatoforów samicy. Tarcza grzbietowa niemal w całości pokrywa idiosomę. Dużą część idiosomy samicy zajmują organy rozrodcze, które są szczególnie wyraźne na krótko przed złożeniem jaj. W powierzchni brzusznej można wyróżnić tarczę mostkową i tarczę płciową. Wszystkie pary odnóży wyposażone są we włosie i kolce. Włosie służy do ustabilizowania pozycji podczas poruszana się w glebie lub na jej powierzchni. Pierwsza para odnóży używana jest głównie jako antena. Druga pada odnóży służy nie tylko do poruszania się, ale również do zaciśnięcia na ofierze. Kolce znajdujące się na czwartej parze odnóży mogą służyć jako ochrona, a także jako „siła napędowa” (28). Długość samców wynosi 0,55–0,65 mm, a ich waga 10–15 µg. Długość samic wynosi 0,8–0,9 mm, a ich waga 50–60 µg (8) (28) (rys. 1).

Rys. 1

Samica, samiec, protonimfa i larwa *H. aculeifer*.



W temperaturze 23 °C roztocza osiągają dojrzałość płciową odpowiednio po upływie 16 dni (samice) i 18 dni (samce) (6). Samice przenoszą plemniki za pomocą solenostom, skąd następnie zostają one przeniesione do pokładełka. W pokładełku plemniki są przechowywane i dojrzewają. Do zapłodnienia dochodzi dopiero, gdy plemniki w pokładełku osiągną dojrzałość. Zapłodnione lub niezapłodnione jaja będą składane przez samice w skupiskach lub oddzielnie, najlepiej w szczelinach lub otworach. Kopulujące samice mogą wydać osobniki młode obu płci, natomiast z jaj niekopulujących samic wylęgną się jedynie młode osobniki męskie. Podczas procesu osiągania dojrzałości osobnik przechodzi cztery fazy rozwoju (jajo–larwa, larwa–protonimfa, protonimfa–poczwarka, poczwarka–osobnik dorosły).

Jajo ma barwę mleczno-białą, jest szkliste, ma eliptyczny kształt i około 0,37 mm długości oraz solidną skorupę. Zgodnie z pozycją bibliograficzną (8) larwy osiągają rozmiar 0,42–0,45 mm. Mają tylko trzy pary odnóży. W okolicy głowy posiadają rozwinięte nogogłaszczki i szczękoczułki. Szczękoczułki wyposażone w kilka małych ząbków służą do wyklucia się z jaja. Po pierwszej wylince, 1–2 dni po wylęgu, rozwijają się protonimfy. Są również białe, osiągają rozmiar 0,45–0,62 mm (8) i mają cztery pary odnóży. Na całej powierzchni szczękoczułek obecne są zęby. Począwszy od tego stadium, roztocza zaczynają szukać pożywienia. Z tego powodu powłoka ofiary jest przebijana szczękoczułkami i produkt dodatkowego trawienia jelitowego jest wydzielany do ofiary. Roztocza

▼**M6**

mogą więc wessać rozdrobniony pokarm. Szczękoczułki mogą również służyć do rozdrabniania większych cząstek pokarmu (28). Po kolejnej wylince rozwijają się poczwarki. Osiągają rozmiar od 0,60 do 0,80 mm (8) i mają barwę od żółtej do jasnobrązowej. Począwszy od tego etapu można je podzielić na samice i samce. Po kolejnej wylince, podczas której zwierzęta są nieaktywne i wykształca się brązowa tarcza (po ok. 14 dniach), roztocza stają się osobnikami dorosłymi (28) (29) (30). Ich cykl życia wynosi około 48–100 dni w temperaturze 25 °C (27).

▼M6

Dodatek 8

Podsumowanie i harmonogram głównych działań, jakie należy podjąć, aby wykonać badanie Hypoaspis

Czas (dni) rozpoczęcia badania = dzień 0	Działanie/zadanie
Dzień – 35 – 28.	Przenieść samice z kultury wyjściowej, aby wyczyścić naczynie w celu rozpoczęcia synchronizacji 2 dni później: usunąć wszystkie samice Dwa lub trzy razy w tygodniu: dostarczać odpowiedni pokarm
Dzień – 5 (+/– 2)	Przygotować sztuczną glebę
Dzień – 4 (+/– 2)	Określić pojemność wodną sztucznej gleby (WHC) Suszyć przez noc Następnego dnia: zważyć próbki i obliczyć WHC
Dzień – 4 (+/– 2)	Nawilżyć wstępnie sztuczną glebę do osiągnięcia 20–30 % WHC
Dzień 0	Rozpoczęcie badania: dodać badaną substancję chemiczną do sztucznej gleby Wprowadzić 10 samic do każdej kontrpróby Zważyć każdą kontrpróbę Przygotować abiotyczne próby kontrolne w odniesieniu do zawartości wilgoci i pH, 2 kontrpróby do każdego zabiegu Suszyć próby kontrolne z wilgocią przez noc Następnego dnia: zważyć próby kontrolne z wilgocią Następnego dnia: zmierzyć pH suchych abiotycznych prób kontrolnych
Dzień 3, 6, 9, 12 (w przybliżeniu)	Dostarczyć każdej kontrpróbie wystarczającą ilość organizmów służących za pokarm Zważyć każdą kontrpróbę i ostatecznie uzupełnić odparowaną wodę
Dzień 14	Zakończyć badanie, rozpocząć ekstrakcję we wszystkich kontrpróbach oraz kontrolę skuteczności ekstrakcji Suszyć przez noc próby kontrolne z zawartością wody Następnego dnia: zważyć próby kontrolne z zawartością wody Następnego dnia: zmierzyć pH suchych prób kontrolnych
Dzień 16	Zakończyć ekstrakcję
Dzień 16 +	Odnotować liczbę osobników dorosłych i młodych w wydobytym materiale Opisać wyniki we wzorcowych tabelach Opisać procedurę badawczą w arkuszu protokołu dotyczącego badania.

▼M6

C.37. **21-DNIOWE BADANIE RYB: KRÓTKOTERMINOWE BADANIE PRZESIEWOWE AKTYWNOŚCI ESTROGENNEJ I ANDROGENNEJ ORAZ ZAHAMOWANIE AROMATAZY**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 230 (2009). Konieczność opracowania i zweryfikowania badania ryb umożliwiającego wykrycie określonych substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego wynika z obawy, że środowiskowe poziomy substancji chemicznych mogą wywoływać działania niepożądane zarówno u ludzi, jak i w przypadku dzikiej flory i fauny ze względu na interakcję tych substancji chemicznych z układem hormonalnym. W 1998 r. OECD zapoczątkowała działania o najwyższym priorytecie mające na celu przegląd istniejących wytycznych dotyczących badań i opracowanie nowych wytycznych dotyczących odsiewania i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Jednym z elementów tych działań było opracowanie wytycznej dotyczącej badań w odniesieniu do odsiewania substancji chemicznych oddziałujących na układ hormonalny określonych gatunków ryb. 21-dniowe badanie przesiewowe układu hormonalnego ryb poddano zakrojonemu na szeroką skalę programowi weryfikacji, który obejmował badania międzylaboratoryjne z wykorzystaniem wybranych substancji chemicznych, aby wykazać, że badanie przesiewowe stanowi istotną i wiarygodną metodę wykrywania substancji chemicznych hamujących aktywność estrogenną i aromatazę (1, 2, 3, 4, 5) u trzech badanych gatunków ryb (*Pimephales promelas*, ryżanki japońskiej i danio pręgowanego); wykrycie działania androgennego jest możliwe u *Pimephales promelas* i ryżanki, lecz nie w przypadku danio pręgowanego. Niniejsza metoda badawcza nie pozwala jednak na wykrycie substancji chemicznych o działaniu antyandrogennym. Działania weryfikacyjne zostały zrecenzowane przez panel ekspertów powołanych przez koordynatorów krajowych programu wytycznych dotyczących badań (6). Przedmiotowe badanie nie ma na celu zidentyfikowania konkretnych mechanizmów zaburzeń hormonalnych, ponieważ zwierzęta użyte do badania mają nieuszkodzoną oś podwzgórze-przysadka-gonady, która może reagować na substancje chemiczne wywierające wpływ na oś podwzgórze-przysadka-gonady na różnych poziomach. Krótkoterminowe badanie rozrodczości ryb (dotycząca badań wytyczna OECD nr 229) obejmuje płodność i, w razie potrzeby, histopatologię gonad w przypadku *Pimephales promelas*, jak również wszystkie punkty końcowe uwzględnione w niniejszej metodzie badawczej. W dotyczącej badań wytycznej OECD nr 229 przewidziano badanie przesiewowe substancji chemicznych, które mają wpływ na rozrodczość, za pomocą różnych mechanizmów, w tym zmian hormonalnych. Należy to rozważyć przed wyborem najodpowiedniejszej metody badawczej.

2. W niniejszej metodzie badawczej opisuje się badanie przesiewowe *in vivo*, w którym dojrzałe płciowo samce ryb i samice ryb w okresie tarła przetrzymuje się razem i poddaje działaniu substancji chemicznej przez ograniczoną część ich cyklu życia (21 dni). Na zakończenie 21-dniowego okresu narażenia, w zależności od wykorzystanego gatunku, mierzy się jeden lub dwa punkty końcowe dotyczące biomarkerów dla samców i samic jako wskaźniki działania estrogennego, zahamowania aromatazy lub działania androgennego badanej substancji chemicznej; te punkty końcowe to witellogenina i drugorzędne cechy płciowe. Witellogeninę mierzy się u *Pimephales promelas*, ryżanki japońskiej i danio pręgowanego, zaś drugorzędne cechy płciowe mierzy się tylko u *Pimephales promelas* i ryżanki japońskiej.

3. Ten test biologiczny służy jako badanie przesiewowe *in vivo* dla określonych trybów działania hormonalnego, a jego zastosowanie należy rozpatrywać w kontekście dokumentu zatytułowanego „OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” (28).

UWAGI WSTĘPNE I OGRANICZENIA

4. Witellogenina jest normalnie wytwarzana w wątrobie jajorodnych kręgowców płci żeńskiej w reakcji na endogenny estrogen w układzie krążenia. Jest ona prekursorem białek żółtka i po wytworzeniu w wątrobie jest przenoszona przez krew do jajnika, gdzie jest pobierana i modyfikowana przez rozwijające się komórki jajowe. Witellogenina jest niemalże niewykrywalna w osoczu niedojrzałych samic i samców ryb, ponieważ nie mają one wystarczającej ilości estrogenu w krwiobiegu; wątroba ma jednak zdolność syntezy i wydzielania witellogeniny w reakcji na egzogenną stymulację estrogenem.

▼M6

5. Pomiar witellogeniny służy wykrywaniu substancji chemicznych o różnych estrogennych charakterach działania. Wykrycie estrogennych substancji chemicznych jest możliwe dzięki pomiarowi indukcji witellogeniny u samców ryb i zostało bogato udokumentowane w recenzowanej literaturze naukowej (np. (7). Indukcję witellogeniny wykazano również po narażeniu na działanie aromatyzowalnych androgenów (8, 9). Obniżenie poziomu estrogenu w układzie krążenia w przypadku samic, na przykład na skutek zahamowania aromatazy przekształcającej endogenny androgen w naturalny estrogen 17β-estradiol, powoduje zmniejszenie poziomu witellogeniny, co wykorzystuje się do wykrywania substancji chemicznych działających jak inhibitory aromatazy (10, 11). Biologiczne znaczenie reakcji witellogeniny po zahamowaniu aktywności substancji estrogennej/aromatazy zostało ustalone i szeroko udokumentowane. Możliwe jest jednak, że na wytwarzanie VTG u samic mogą również wpływać ogólna toksyczność i niehormonalne charaktery działania toksycznego, np. hepatotoksyczność.

6. Opracowano i znormalizowano z dobrym wynikiem kilka metod pomiaru w celu rutynowego wykorzystywania. Dotyczy to metod opartych na właściwym dla danego gatunku teście immunoenzymatycznym (ELISA), w którym wykorzystuje się immunochemię do oznaczenia ilościowego wytworzonej witellogeniny w małych próbkach krwi lub wątroby pobranych od pojedynczych osobników ryb (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). W celu dokonania pomiaru VTG pobiera się próbki krwi *Pimephales promelas*, krwi lub homogenatu głowy/ogona danio pręgowanego i wątroby ryżanki japońskiej. W przypadku ryżanki istnieje dobra korelacja między VTG mierzoną w próbkach krwi i wątroby (19). W dodatku 6 przedstawia się zalecane procedury pobierania próbek do celów analizy witellogeniny. Zestawy do pomiaru witellogeniny są powszechnie dostępne; powinny one opierać się na zweryfikowanej, właściwej dla danego gatunku metodzie ELISA.

7. Drugorzędne cechy płciowe samców niektórych gatunków ryb są widoczne na zewnątrz, są kwantyfikowalne oraz reagują na poziom endogennych androgenów w krwiobiegu; dotyczy to *Pimephales promelas* i ryżanki, lecz nie danio pręgowanego, który nie posiada kwantyfikowalnych drugorzędnych cech płciowych. Samice zachowują zdolność do wykształcania drugorzędnych męskich cech płciowych, gdy zostaną narażone na działanie androgennych substancji chemicznych w wodzie. W literaturze przedmiotu można znaleźć kilka badań, które dokumentują tego rodzaju reakcję u *Pimephales promelas* (20) i ryżanki (21). Zmniejszenie nasilenia drugorzędnych cech płciowych u samców należy interpretować ostrożnie, ze względu na niską wartość mocy statystycznej, oraz opierać się na specjalistycznej opinii i wadze dowodów. Istnieją ograniczenia w zakresie wykorzystania danio pręgowanego w tym badaniu ze względu na brak kwantyfikowalnych drugorzędnych cech płciowych, które reagują na substancje chemiczne o działaniu androgennym.

8. W przypadku *Pimephales promelas* głównym wskaźnikiem egzogennego narażenia na działanie androgenne jest liczba guzków godowych na pysku samic ryb. W przypadku ryżanki liczba procesów tworzenia się brodawek stanowi główny marker egzogennego narażenia samic ryb na substancje chemiczne o działaniu androgennym. W dodatkach 5A i 5B wskazano zalecane procedury, które należy stosować do oceny cech płciowych odpowiednio u *Pimephales promelas* i ryżanki.

9. Definicje stosowane w niniejszej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

10. W trakcie badania samce i samice ryb w stanie reprodukcyjnym poddaje się wspólnie narażeniu w naczyniach badawczych. Ich status osobników dorosłych oraz ich stan reprodukcyjny pozwalają na wyraźne rozróżnienie płci, a w związku z tym zapewniają możliwość przeprowadzenia związanej z płcią analizy każdego parametru docelowego, jak również wrażliwość

▼M6

na egzogenne substancje chemiczne. Po zakończeniu badania płeć potwierdza się w badaniu makroskopowym gonad po otwarciu brzucha wzdłuż linii środkowej za pomocą nożyczek. Przegląd odpowiednich warunków testu biologicznego przedstawiono w dodatku 2. Badanie zwykle rozpoczyna się od pobrania próbki ryb z populacji w okresie tarła; nie należy wykorzystywać starzejących się zwierząt. Wytyczne dotyczące wieku ryb i stanu reprodukcyjnego podano w części dotyczącej wyboru ryb. Badanie przeprowadza się z zastosowaniem trzech stężeń ekspozycyjnych, jak również próby kontrolnej z wodą oraz, w razie potrzeby, próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem. Stosuje się dwa naczynia lub kontrpróby na zabieg (każde naczynie zawiera 5 samców i 5 samic) w przypadku ryżanki i danio pręgowanego, zaś w przypadku *Pimephales promelas* stosuje się cztery naczynia lub kontrpróby na zabieg (przy czym każde naczynie zawiera 2 samce i 4 samice). Służy to uwzględnieniu zachowania terytorialnego samców *Pimephales promelas*, przy równoczesnym utrzymaniu wystarczającej mocy testu. Narażenie trwa 21 dni, a pobranie próbek ryb odbywa się w 21. dniu narażenia.

11. Przy pobraniu próbek w 21. dniu wszystkie zwierzęta uśmierca się w sposób humanitarny. Drugorzędne cechy płciowe mierzy się u *Pimephales promelas* i ryżanki (zob. dodatki 5A i 5B); próbki krwi pobiera się w celu oznaczenia witellogeniny u danio pręgowanego i *Pimephales promelas*, ewentualnie można pobrać głowę/ogon w celu oznaczenia witellogeniny u danio pręgowanego (dodatek 6); w celu analizy VTG u ryżanki pobiera się wątrobę (dodatek 6).

KRYTERIA AKCEPTACJI BADANIA

12. Aby wyniki badania były akceptowalne, muszą zostać spełnione następujące warunki:

— śmiertelność w próbach kontrolnych z wodą (lub rozpuszczalnikiem) nie powinna przekraczać 10 % na koniec okresu narażenia;

— stężenie tlenu rozpuszczonego powinno wynosić co najmniej 60 % wartości nasycenia powietrzem (ASV) w trakcie okresu narażenia;

— różnica temperatury wody między naczyniami badawczymi przez cały okres narażenia nie może być większa niż ± 1,5 °C i musi być utrzymywana w granicach 2 °C zakresu temperatur określonego w odniesieniu do badanego gatunku (dodatek 2);

— powinny być dostępne dowody pozwalające wykazać, że stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze utrzymano w granicach ± 20 % średnich wartości pomiarowych.

OPIS METODY

Aparatura

13. Zwykły sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

a) mierniki tlenu i pehametry;

b) sprzęt do oznaczania twardości i zasadowości wody;

c) odpowiednia aparatura do pomiaru temperatury, zalecane jest stałe monitorowanie;

d) zbiorniki wykonane z chemicznie obojętnego materiału o odpowiedniej objętości w zależności od zalecanego obciążenia i obsady (zob. dodatek 2);

e) podłoże tarłowe dla *Pimephales promelas* i danio pręgowanego, niezbędne informacje podano w dodatku 4;

f) waga o odpowiedniej dokładności (tj. dokładności do ± 0,5 mg).

▼M6

Woda

14. Każda woda, w której badane gatunki wykazują odpowiednie długoterminowe przeżycie i wzrost, może być stosowana jako woda do badań. Powinna mieć stałą jakość w okresie trwania badania. Wartość pH wody powinna mieścić się w zakresie 6,5–8,5, lecz w trakcie danego badania powinna wynosić ± 0,5 jednostki pH. Aby upewnić się, że woda rozcieńczająca nie będzie wpływała zbytnio na wyniki badania (np. przez kompleksowanie badanej substancji chemicznej), należy okresowo pobierać próbki wody do analizy. W przypadku gdy wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, należy mierzyć, np. co trzy miesiące, zawartość metali ciężkich (np. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, i SO_4^{2-}), pestycydów (np. całkowitą zawartość pestycydów fosforoorganicznych i chloroorganicznych), całkowitą zawartość węgla organicznego i zawiesinę ogólną. Jeśli można wykazać, że jakość wody była stała przez co najmniej rok, oznaczeń można dokonywać rzadziej i w większych odstępach czasu (np. co sześć miesięcy). Niektóre właściwości chemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej wymieniono w dodatku 3.

Roztwory do badań

15. Roztwory do badań o wybranych stężeniach przygotowuje się przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Zalecane jest przygotowanie roztworu podstawowego przez zwykłe wymieszanie lub zbełtanie badanej substancji chemicznej w wodzie rozcieńczającej w sposób mechaniczny (np. za pomocą mieszadła lub ultradźwięków). Kolumny nasyceniowe (rozpuszczające) stosuje się w celu uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Nie zaleca się stosowania nośnika rozpuszczalnikowego. W przypadku gdy rozpuszczalnik jest niezbędny, należy równolegle przeprowadzić próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem w tym samym stężeniu rozpuszczalnika, które zastosowano w grupie poddanej zabiegom chemicznym. W przypadku substancji chemicznych, których badanie nastręcza trudności, rozpuszczalnik możne stanowić najlepsze rozwiązanie z technicznego-punktu widzenia; należy zapoznać się z wydanym przez OECD „Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures” (22). Wybór rozpuszczalnika będzie uwarunkowany chemicznymi właściwościami substancji chemicznej. W wytycznych OECD zaleca się maksymalne stężenie 100 µl/l i do tego zalecenia należy się zastosować. W niedawnym przeglądzie (23) podkreślono jednak dodatkowe obawy związane ze stosowaniem rozpuszczalników do badania funkcjonowania układu hormonalnego. W związku z tym zaleca się, aby w razie konieczności minimalizować stężenie rozpuszczalnika, jeżeli tylko jest to technicznie wykonalne (w zależności od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej).

16. Zastosowany zostanie przepływowy układ badawczy. Układ taki stale dozuje i rozcieńcza roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej (np. pompa dozująca, rozcieńczalnik proporcjonalny, układ nasycalnika) w celu przesyłania szeregu stężeń do komór badawczych. Natężenia przepływów roztworów podstawowych i wody rozcieńczającej należy sprawdzać okresowo, najlepiej codziennie, przez cały okres badania, przy czym nie mogą różnić się one o więcej niż 10 % w trakcie badania. Należy starać się unikać stosowania rur z tworzywa sztucznego niskiej klasy lub innych materiałów, które mogą zwierać aktywne biologicznie substancje chemiczne. Podczas selekcji materiału do przepływowego układu badawczego należy uwzględnić możliwą adsorpcję badanej substancji chemicznej do danego materiału.

Utrzymanie ryb

17. Badane ryby należy wybrać z populacji laboratoryjnej, najlepiej z jednego stada, które przez co najmniej dwa tygodnie przed badaniem było aklimatyzowane w warunkach jakości wody i oświetlenia zbliżonych do stosowanych w badaniu. Ważne jest, aby wskaźnik obciążenia i obsada (definicje można znaleźć w dodatku 1) były odpowiednie dla gatunków użytych do badania (zob. dodatek 2).

18. Po 48-godzinnym okresie adaptacji odnotowuje się przypadki śmiertelności i zastosowanie mają następujące kryteria:

▼M6

— śmiertelność przekracza 10 % populacji w ciągu siedmiu dni: należy odrzucić całą partię;

— śmiertelność na poziomie 5–10 % populacji: aklimatyzacja przez siedem dodatkowych dni; jeżeli śmiertelność przekroczy 5 % w ciągu tych kolejnych siedmiu dni, należy odrzucić całą partię;

— śmiertelność poniżej 5 % populacji w ciągu siedmiu dni: należy zaakceptować partię.

19. Ryby nie powinny być leczone na żadną chorobę w okresie aklimatyzacji, w okresie poprzedzającym narażenie ani w okresie narażenia.

Okres poprzedzający narażenie i wybór ryb

20. Zaleca się tygodniowy okres poprzedzający narażenie, w którym zwierzęta umieszcza się w naczyniach podobnych do faktycznych naczyń użytych do badania. Ryby należy karmić bez ograniczeń przez cały okres utrzymywania i na etapie narażenia. Etap narażenia rozpoczyna się z wykorzystaniem dorosłych ryb wykazujących dymorfizm płciowy z laboratoryjnego źródła zwierząt dojrzałych płciowo (np. o wyraźnych drugorzędnych cechach płciowych widocznych w przypadku *Pimephales promelas* i ryżanki), oraz wykazujących aktywność tarłową. Zgodnie z ogólną wytyczną (której nie należy stosować w oderwaniu od obserwacji rzeczywistego stanu reprodukcyjnego danej partii ryb) *Pimephales promelas* powinny być w wieku około 20 tygodni (± 2 tygodnie), zakładając, że były hodowane w temperaturze 25 ± 2 °C przez całą długość życia. Ryżanki japońskie powinny być w wieku około 16 tygodni (± 2 tygodnie), zakładając, że były hodowane w temperaturze 25 ± 2 °C przez całą długość życia. Danio pręgowane powinny być w wieku około 16 tygodni (± 2 tygodnie), zakładając, że były hodowane w temperaturze 26 ± 2 °C przez całą długość życia.

PROJEKT BADANIA

21. Stosuje się trzy stężenia badanej substancji chemicznej, jedną próbę kontrolną (z wodą) i, w razie potrzeby, jedną próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem. Dane można analizować w celu określenia statystycznie istotnych różnic między reakcjami w grupie badanej i grupie kontrolnej. Analizy te dostarczą informacji, czy wymagane jest dalsze długoterminowe badanie substancji chemicznej pod kątem negatywnych skutków (mianowicie wpływu na przeżycie, rozwój, wzrost i rozrodczość), czy też badanie takie ma służyć do oceny ryzyka (24).

22. W przypadku danio pręgowanego i ryżanki w 21. dniu badania pobiera się próbkę samców i samic z każdego poziomu zabiegu (5 samców i 5 samic w każdej z dwóch kontrprób) i z grup kontrolnych w celu dokonania pomiaru witellogeniny i, w stosownych przypadkach, drugorzędnych cech płciowych. W przypadku *Pimephales promelas* w 21. dniu narażenia pobiera się próbkę samców i samic (2 samce i 4 samice z każdej z czterech kontrprób i z grup kontrolnych) w celu dokonania pomiaru witellogeniny i drugorzędnych cech płciowych.

Dobór badanych stężeń

23. Do celów niniejszego badania najwyższym stężeniem badanej substancji powinna być wartość maksymalnego tolerowanego stężenia wyznaczonego w badaniu ustalającym zakres lub za pomocą innych danych dotyczących toksyczności, lub 10 mg/l lub wartość maksymalnej rozpuszczalności w wodzie, w zależności od tego, która wartość jest najniższa. Maksymalne tolerowane stężenie definiuje się jako najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej, którego skutkiem jest mniej niż 10 % przypadków śmiertelnych. Przy zastosowaniu tego podejścia zakłada się istnienie empirycznych danych dotyczących ostrych przypadków toksyczności lub innych danych dotyczących toksyczności, na podstawie których można oszacować maksymalne tolerowane stężenie. Oszacowanie MTC może być niedokładne i zazwyczaj wymaga jeszcze oceny według najlepszej fachowej wiedzy osoby wykonującej badanie.

▼M6

24. Wymagane są trzy badane stężenia, które różnią się o taką samą wielokrotność nieprzekraczającą 10, oraz próba kontrolna z wodą rozcieńczającą (oraz, w razie potrzeby, z rozpuszczalnikiem). Zaleca się współczynnik rozstawienia stężeń wynoszący od 3,2 do 10.

PROCEDURA

Wybór i ważenie ryb użytych do badania

25. Istotne jest, aby zminimalizować zmienność masy ryb na początku badania. Odpowiedni zakres wielkości dla różnych gatunków zalecanych do wykorzystania w tym badaniu podano w dodatku 2. W odniesieniu do całej partii ryb wykorzystanych w badaniu zakres poszczególnych mas samców i samic ryb na początku badania należy w miarę możliwości utrzymać w zakresie ± 20 % średniej arytmetycznej masy dla tej samej płci. Zaleca się zważenie podpróbki ze stada ryb przed rozpoczęciem badania w celu oszacowania średniej masy.

Warunki narażenia

Czas trwania

26. Czas trwania badania, następujący po okresie poprzedzającym narażenie, wynosi 21 dni. Zalecany okres poprzedzający narażenie wynosi tydzień.

Karmienie

27. Ryby należy karmić bez ograniczeń, podając odpowiedni pokarm (dodatek 2), w porcjach wystarczających do utrzymania stanu fizycznego. Należy starać się zapobiegać rozwojowi mikroorganizmów i mętności wody. Zgodnie z ogólną wytyczną dzienną dawkę pokarmową można podzielić na dwie lub trzy równe porcje podawane w kilku karmieniach dziennie w odstępach co najmniej trzech godzin między karmieniami. Dopuszczalna jest jedna większa dawka, w szczególności w weekendy. Karmienia ryb należy zaprzestać na 12 godzin przed pobraniem próbek/autopsją.

28. Paszę dla ryb należy ocenić pod kątem obecności zanieczyszczeń, takich jak pestycydy chloroorganiczne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), polichlorowane bifenyle (PCB). Należy unikać pokarmów o podwyższonej zawartości fitoestrogenów, które mogłyby zakłócić w badaniu reakcję na znanego agonistę estrogenu (np. 17β-estradiol).

29. Niezjedzony pokarm i odchody należy usuwać z naczyń badawczych co najmniej dwa razy w tygodniu, np. ostrożnie czyszcząc dno każdego zbiornika za pomocą syfonu.

Światło i temperatura

30. Fotoperiod i temperatura wody muszą być odpowiednie dla badanego gatunku (zob. dodatek 2).

Częstotliwość analitycznych oznaczeń i pomiarów

31. Przed rozpoczęciem okresu narażenia należy upewnić się, że system podawania substancji chemicznej działa prawidłowo. Należy ustalić wszystkie potrzebne metody analityczne, w tym zgromadzić dostateczną wiedzę na temat stabilności układu badawczego. W trakcie badania stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w regularnych odstępach czasu w następujący sposób: natężenia przepływów rozcieńczalnika i roztworu podstawowego substancji toksycznej należy sprawdzać najlepiej codziennie, a co najmniej dwa razy na tydzień, przy czym nie powinny one różnić się o więcej niż 10 % przez cały okres trwania badania. Zaleca się, aby faktyczne stężenia badanej substancji chemicznej mierzyć we wszystkich naczyniach na początku badania, a następnie w odstępach tygodniowych.

32. Zaleca się, aby wyniki były oparte na mierzonych stężeniach. Jeżeli jednak stężenie badanej substancji chemicznej w roztworze można z powodzeniem utrzymywać w zakresie ± 20 % nominalnego stężenia przez okres badania, wówczas wyniki mogą opierać się albo na wartościach nominalnych, albo na wartościach pomiarowych.

33. Próbki mogą wymagać przefiltrowania (np. przez filtr z porami o średnicy 0,45 μm) lub odwirowania. Jeżeli jest to konieczne, wówczas zalecaną procedurą jest odwirowanie. Jeżeli jednak badany materiał nie ulega adsorpcji na filtrze, dopuszczalna jest też filtracja.

▼M6

34. Podczas badania we wszystkich naczyniach badawczych co najmniej raz na tydzień należy zmierzyć stężenie rozpuszczonego tlenu, temperaturę i pH. Całkowitą twardość i zasadowość należy mierzyć w próbach kontrolnych i w jednym naczyniu przy najwyższym stężeniu co najmniej raz na tydzień. Zalecane jest stałe monitorowanie temperatury w co najmniej jednym naczyniu badawczym.

Obserwacje

35. W czasie trwania badania albo po jego zakończeniu ocenia się szereg reakcji ogólnych (np. przeżycie) i podstawowych reakcji biologicznych (np. poziomy witellogeniny). Procedurę pomiaru i oceny tych punktów końcowych i ich przydatność opisano poniżej.

Przeżycie

36. W okresie badania ryby należy badać codziennie i odnotowywać wszelkie przypadki śmiertelne, zaś martwe ryby należy jak najszybciej usuwać. Martwych ryb nie należy zastępować nowymi ani w naczyniu kontrolnym, ani w naczyniu z badaną substancją. Płeć ryb, które padają w trakcie badania, należy ustalić poprzez makroskopową ocenę gonad.

Zachowanie i wygląd

37. Należy odnotować wszelkie przypadki nietypowego zachowania (w porównaniu z grupami kontrolnymi), które mogą obejmować oznaki ogólnej toksyczności, w tym hiperwentylację, nieskoordynowane pływanie, utratę równowagi i nietypowy spokój lub nietypowy sposób żerowania. Dodatkowo należy odnotować anomalie zewnętrzne (takie jak krwotok, sinica). Do takich oznak toksyczności należy podchodzić ostrożnie podczas interpretacji danych, ponieważ mogą one wskazywać na stężenia, przy których biomarkery aktywności hormonalnej nie są wiarygodne. Takie obserwacje zachowania mogą również dostarczyć przydatnych informacji jakościowych na potrzeby potencjalnych przyszłych wymogów dotyczących badań ryb. Na przykład zaobserwowano agresję terytorialną u normalnych samców lub zmaskulinizowanych samic *Pimephales promelas* po narażeniu na substancję o działaniu androgennym; u danio pręgowanego charakterystyczne zachowania związane z kryciem i tarłem po pojawieniu się światła o brzasku ulegają ograniczeniu lub zmniejszeniu wskutek narażenia na substancje o działaniu estrogennym i antyandrogennym.

38. Ponieważ niektóre aspekty wyglądu (przede wszystkim zabarwienie) mogą zmieniać się szybko w zależności od sposobu postępowania, ważne jest, aby obserwacji jakościowych dokonywać przed usunięciem zwierząt z układu badawczego. Jak wynika z dotychczasowych doświadczeń z *Pimephales promelas*, niektóre substancje chemiczne zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego mogą początkowo wywoływać zmiany w następujących cechach zewnętrznych: zabarwieniu ciała (jasne albo ciemne), wzorze zabarwienia (występowanie pionowych pręg) i kształcie ciała (głowa i obszar piersiowy). Dlatego też wygląd fizyczny ryb należy obserwować w trakcie badania i po jego zakończeniu.

Humanitarne uśmiercanie ryb

39. W 21. dniu, tj. po zakończeniu narażenia, ryby należy uśpić, podając im odpowiednie ilości trikainy (metanosulfonioanu trikainy, MS-222 (CAS 886-86-2) 100–500 mg/l buforowanej 300 mg/l $NaHCO_3$ (wodorowęglanu sodu, CAS 144-55-8) w celu ograniczenia podrażnienia błon śluzowych; następnie pobiera się próbki krwi lub tkanek w celu oznaczenia witellogeniny, jak wyjaśniono w części dotyczącej witellogeniny.

▼M6

Obserwacja drugorzędnych cech płciowych

40. Niektóre substancje chemiczne zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego mogą wywoływać zmiany w wyspecjalizowanych drugorzędnych cechach płciowych (liczbie guzków godowych u *Pimephales promelas*, procesie tworzenia się brodawek u samców ryżanki). Zwłaszcza substancje chemiczne o określonym charakterze działania mogą powodować nietypowe pojawianie się drugorzędnych cech płciowych u zwierząt przeciwnej płci; na przykład substancje będące agonistami receptorów androgenowych, takie jak trenbolon, metylotestosteron i dihydrotestosteron, mogą spowodować powstawanie u samic *Pimephales promelas* widocznych guzków godowych lub tworzenie się brodawek u samic ryżanki (11, 20, 21). Odnotowano również, że agoniści receptorów estrogenowych mogą zmniejszać liczebność guzków godowych i wielkość wyściółki tłuszczowej na grzbiecie u dorosłych samców (25, 26). Takie całościowe obserwacje morfologiczne mogą również dostarczyć przydatnych informacji ilościowych i jakościowych na potrzeby potencjalnych przyszłych wymogów dotyczących badań ryb. Liczbę i wielkość guzków godowych u *Pimephales promelas* i procesów tworzenia się brodawek u ryżanki można określić ilościowo bezpośrednio albo, co jest bardziej praktycznym sposobem, u utrwalonych okazów. Zalecane procedury oceny drugorzędnych cech płciowych u *Pimephales promelas* i ryżanki można znaleźć odpowiednio w dodatkach 5A i 5B.

Witellogenina (VTG)

41. Krew pobiera się z tętnicy/żyły ogonowej za pomocą kapilary mikrohematokrytowej powlekanej heparyną lub ewentualnie przez nakłucie serca za pomocą strzykawki. W zależności od wielkości ryby objętość krwi, jaką można pobrać, wynosi zwykle 5–60 µl na osobnika w przypadku *Pimephales promelas* i 5–15 µl na osobnika w przypadku danio pręgowanego. Osocze oddziela się od krwi przez odwirowanie i przechowuje z inhibitorami proteaz w temperaturze – 80 °C do czasu przeprowadzenia analizy pod kątem witellogeniny. Alternatywnym źródłem tkanki do oznaczenia witellogeniny u ryżanki będzie wątroba, zaś u danio pręgowanego można wykorzystać homogenat głowy/ogona (dodatek 6). Pomiar VTG powinien opierać się na zweryfikowanej homologicznej metodzie ELISA, w której wykorzystuje się homologiczną normę VTG i homologiczne przeciwciała. Zaleca się stosowanie metody pozwalającej na wykrycie poziomów VTG wynoszących zaledwie kilka ng/ml osocza (lub ng/mg tkanki), co stanowi poziom tła w przypadku samców ryb nienarażonych na działanie substancji.

42. Kontrola jakości analizy poziomu witellogeniny zostanie przeprowadzona z wykorzystaniem norm, prób ślepych i przynajmniej analiz powtórnych. W przypadku każdej metody ELISA należy przeprowadzić test na wpływ matrycy (wpływ rozcieńczenia próbki) w celu oznaczenia minimalnego współczynnika rozcieńczenia próbki. Każda płytka do testu ELISA wykorzystana do badań VTG powinna zawierać następujące próbki kontroli jakości: co najmniej 6 wzorców kalibracyjnych obejmujących zakres oczekiwanych stężeń witellogeniny i co najmniej jedną niespecyficzną wiążącą próbę ślepą (poddawaną analizom powtórnym). Absorbancja tych prób ślepych powinna wynosić poniżej 5 % maksymalnej absorbancji wzorca kalibracyjnego. Analizę przeprowadza się dla co najmniej dwóch podwielokrotności (zduplikowane studzienki) każdej rozcieńczonej próbki. Zduplikowane studzienki, które różnią się o więcej niż 20 %, należy poddać ponownej analizie.

43. Współczynnik korelacji (R^2) w przypadku krzywych kalibracyjnych powinien być wyższy niż 0,99. Wysoka korelacja nie jest jednak wystarczająca, aby zagwarantować odpowiednią prognozę stężenia we wszystkich zakresach. Oprócz wystarczająco wysokiej korelacji dla krzywej kalibracyjnej stężenie każdego wzorca, obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej, powinno mieścić się w przedziale 70–120 % stężenia nominalnego. Jeżeli

▼M6

stężenia nominalne oddalają się od kalibracyjnej linii regresji (np. przy niższych stężeniach), konieczny może być podział krzywej kalibracyjnej na zakresy niskie i wysokie lub zastosowanie modelu nieliniowego, aby odpowiednio dopasować dane dotyczące absorbancji. Jeżeli krzywa zostanie podzielona, oba odcinki linii powinny mieć R^2 >0,99.

44. Granicę wykrywalności definiuje się jako najniższe stężenie wzorca analitycznego, a granicę oznaczalności definiuje się jako najniższe stężenie wzorca analitycznego pomnożone przez najniższy współczynnik rozcieńczenia.

45. Każdego dnia, w którym przeprowadza się badania witellogeniny, zostanie przeanalizowana próbka wzmocniona przygotowana z zastosowaniem międzylaboratoryjnego wzorca referencyjnego (dodatek 7). Stosunek oczekiwanego stężenia do zmierzonego stężenia zostanie odnotowany wraz z wynikami każdego zbioru badań przeprowadzonych w danym dniu.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena reakcji biomarkerów za pomocą analizy wariancji (ANOVA)

46. W celu zidentyfikowania potencjalnego działania substancji chemicznej zaburzającego funkcjonowanie układu hormonalnego porównuje się reakcje grup badanych i grup kontrolnych z zastosowaniem analizy wariancji (ANOVA). W przypadku wykorzystania próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem należy przeprowadzić odpowiedni test statystyczny dla próby kontrolnej z wodą rozcieńczającą i próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem w odniesieniu do każdego punktu końcowego. Wytyczne na temat wykorzystania danych dotyczących próby kontrolnej z wodą rozcieńczającą i próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem w późniejszej analizie statystycznej można znaleźć w OECD, 2006c (27). Wszystkie dane na temat reakcji biologicznej należy analizować i odnotowywać oddzielnie dla każdej płci. Jeśli wymagane założenia dotyczące metod parametrycznych nie zostaną spełnione – rozkład nienormalny (np. test Shapiro-Wilka) lub niejednorodna wariancja (test Bartletta lub Levene'a), należy rozważyć przekształcenie danych w celu ujednorodnienia wariancji przed przeprowadzeniem ANOVA lub ważonej ANOVA. W przypadku niemonotonicznej zależności dawka-odpowiedź można zastosować test Dunnetta (parametryczny) wielokrotnych porównań w parach lub test Manna-Whitneya z korektą Bonferroniego (nieparametryczny). Inne testy statystyczne (np. test Jonckheere'a-Terpstry lub test Williamsa) można zastosować, jeżeli zależność dawka-odpowiedź jest w przybliżeniu monotoniczna. W dodatku 8 przedstawiono schemat statystyczny, który ma pomóc w wyborze najodpowiedniejszego testu statystycznego. Dodatkowe informacje można również znaleźć w dokumencie OECD „Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data” (27).

Sprawozdania z wyników testów

47. Dane uzyskane w ramach badania powinny obejmować poniższe informacje.

Placówka badawcza:

— informacje na temat odpowiedzialnych pracowników i ich obowiązków w zakresie badań;

— każde laboratorium powinno wykazać się biegłością w stosowaniu szeregu reprezentatywnych substancji chemicznych.

Badana substancja chemiczna:

— charakterystyka badanej substancji chemicznej;

— właściwości fizyczne i stosowne właściwości fizykochemiczne;

▼**M6**

— metody i częstotliwość przygotowywania badanych stężeń;

— informacje dotyczące stabilności i biodegradowalności.

Rozpuszczalnik:

— charakterystyka rozpuszczalnika (charakter, wykorzystane stężenie);

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika (jeśli jest inny niż woda).

Zwierzęta użyte do badania:

— gatunek i szczep;

— dostawca i określony zakład dostawcy;

— wiek ryb na początku badania i stan reprodukcyjny/okres tarła;

— szczegóły dotyczące procedur aklimatyzacji zwierząt;

— masa ciała ryb na początku okresu narażenia (na podstawie podpróbki ze stada ryb).

Warunki badania:

— zastosowana procedura badawcza (rodzaj badania, wskaźnik obciążenia, obsada itd.);

— metoda przygotowania roztworów podstawowych i natężenie przepływu;

— badane stężenia nominalne, cotygodniowo mierzone stężenia roztworów do badań i zastosowana metoda analityczna, średnie wartości pomiarowych oraz ich odchylenia standardowe w naczyniach badawczych, a także dowody świadczące o tym, że pomiary odnoszą się do stężeń badanej substancji chemicznej w prawdziwym roztworze;

— charakterystyka wody rozcieńczającej (w tym pH, twardość, zasadowość, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom chloru resztkowego, całkowity węgiel organiczny, zawiesina i wszelkie inne wykonane pomiary);

— jakość wody w naczyniach badawczych: pH, twardość, temperatura i stężenie rozpuszczonego tlenu;

— szczegółowe informacje dotyczące karmienia (np. rodzaj pokarmu, jego źródło, podana ilość i częstotliwość podawania oraz analiza pod kątem odpowiednich zanieczyszczeń (np. PCB, WWA oraz pestycydów chloroorganicznych), jeżeli jest dostępna.

Wyniki:

— dowód, że próby kontrolne spełniają kryteria akceptacji badania;

— dane na temat śmiertelności występującej w jakimkolwiek z badanych stężeń i jakiejkolwiek próbie kontrolnej;

— zastosowane techniki statystyczno-analityczne, przetwarzanie danych i uzasadnienie zastosowanych technik;

— dane dotyczące biologicznych obserwacji morfologii makroskopowej, z uwzględnieniem drugorzędnych cech płciowych i witellogeniny;

▼M6

— wyniki analiz danych, przedstawione najlepiej w formie tabelarycznej i graficznej;

— przypadki wszystkich nietypowych reakcji ryb i wszystkie widoczne efekty spowodowane przez badaną substancję chemiczną.

WYTYCZNE DOTYCZĄCE INTERPRETACJI I AKCEPTACJI WYNIKÓW BADANIA

48. W niniejszej części przedstawiono kilka kwestii, które należy uwzględnić przy interpretacji wyników badania w odniesieniu do różnych zmierzonych punktów końcowych. Wyniki te należy interpretować ostrożnie, ilekroć wydaje się, że badana substancja chemiczna powoduje widoczną toksyczność lub wpływa na ogólny stan badanego zwierzęcia.

49. Ustalając zakres badanych stężeń, należy dołożyć starań, aby nie przekroczyć maksymalnego tolerowanego stężenia i umożliwić miarodajną interpretację danych. Ważne jest, aby otrzymać co najmniej jedną próbę poddaną zabiegowi, w której nie ma oznak skutków toksycznych. Oznaki choroby i skutków toksycznych należy dokładnie ocenić i odnotować. Możliwe jest na przykład, że na wytwarzanie VTG u samic mogą również wpływać ogólna toksyczność i niehormonalne sposoby działania toksycznego, np. hepatotoksyczność. Interpretację skutków mogą jednak wzmocnić inne poziomy zabiegu, których nie zakłóci toksyczność ogólnoustrojowa.

50. Istnieje kilka aspektów, które należy rozważyć do celów akceptacji wyników badania. Jako wytyczną można przyjąć, że poziomy VTG w grupach kontrolnych samców i samic powinny być odmienne i powinny się różnić o około trzy rzędy wielkości w przypadku *Pimephales promelas* i danio pręgowanego oraz o około jeden rząd wielkości w przypadku ryżanki. Przykłady zakresu wartości osiąganych w grupach kontrolnych i badanych są dostępne w sprawozdaniach z weryfikacji (1, 2, 3, 4). Wysokie wartości VTG u samców w grupie kontrolnej mogą zakłócić czułość badania i jego zdolność do wykrywania słabych agonistów estrogenu. Niskie wartości VTG u samic w próbie kontrolnej mogą zakłócić czułość badania i jego zdolność do wykrywania inhibitorów aromatazy i agonistów estrogenu. Do opracowania tej wytycznej wykorzystano badania weryfikacyjne.

51. Jeżeli laboratorium nie przeprowadzało jeszcze takiego badania albo wprowadzono istotne zmiany w badaniu (takie jak zmiana gatunku lub dostawcy ryb), zaleca się przeprowadzenie badania biegłości technicznej. Zaleca się stosowanie substancji chemicznych, które mają wiele różnych sposobów działania lub wpływają na wiele punktów końcowych badania. W praktyce zachęca się każde laboratorium do zgromadzenia własnych historycznych danych kontrolnych w odniesieniu do samców i samic oraz do przeprowadzenia kontroli dodatniej pod kątem działania estrogennego (np. 17β-estradiolu w stężeniu 100 ng/l lub znanego słabego agonisty), które prowadzi do podwyższenia poziomu VTG u samców ryb, kontroli dodatniej pod kątem zahamowania aromatazy (np. fadrozolu lub prochlorazu w stężeniu 300 µg/l), które prowadzi do zmniejszenia poziomu VTG u samic ryb, oraz kontroli dodatniej pod kątem działania androgennego (np. 17β-trenbolonu w stężeniu 5 µg/l), które prowadzi do wykształcenia drugorzędnych cech płciowych u samicy *Pimephales promelas* i ryżanki. Aby zagwarantować biegłość laboratorium, wszystkie te dane można porównać z danymi dostępnymi z badań weryfikacyjnych (1, 2, 3).

52. Zasadniczo pomiary witellogeniny należy uznać za dodatnie, jeżeli występuje statystycznie istotny wzrost poziomu VTG u samców ($p < 0,05$) lub statystycznie istotny spadek poziomu u samic ($p < 0,05$) przynajmniej przy najwyższej badanej dawce w porównaniu z grupą kontrolną i przy braku oznak ogólnej toksyczności. Wynik dodatni jest poparty ponadto wykazaniem biologicznie wiarygodnej zależności między dawką a krzywą odpowiedzi. Jak już wspomniano, spadek poziomu witellogeniny może nie mieć wyłącznie hormonalnego pochodzenia; wynik dodatni należy jednak zasadniczo interpretować jako dowód na działanie zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego *in vivo* i powinien on zwykle stanowić bodziec do podjęcia działań w celu dalszego wyjaśnienia.

▼**M6**

BIBLIOGRAFIA

(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). Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 60, ENV/JM/MONO(2006)27.

(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 1 B). Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 61, ENV/JM/MONO(2006)29.

(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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 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 (18/09/08).

(5) Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Nieopublikowane sprawozdanie z dnia 15 grudnia 2007 r. Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych, Waszyngton DC. 104 s.

(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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 94, ENV/JM/MONO(2008)21.

(7) Sumpter i Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 suplement 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 odniesienie do raportu z badania AQ001. CEFIC, Bruksela, Belgia.

(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; tom 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 i 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. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa. Seria dotycząca badań i oceny. nr 23. Paryż.

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; s. 69–92.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 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.

(25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 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.

▼**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 i 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 (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 54. ENV/JM/MONO(2006)18.

(28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (zmieniony). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 150. ENV/JM/MONO(2012)22.

▼**M6**

Dodatek 1

Skróty i definicje

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

CV: współczynnik zmienności.

ELISA: test immunoenzymatyczny.

Wskaźnik obciążenia: mokra masa ryb na objętość wody.

Obsada: liczba ryb na objętość wody.

VTG (witellogenina): fosfolipidoglikoproteinowy prekursor białek żółtka jajka występujący zwykle u aktywnych płciowo samic wszystkich gatunków jajorodnych.

Oś HPG: oś podwzgórze-przysadka-gonady.

MTC: maksymalne tolerowane stężenie, stanowiące około 10 % LC_{50}.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M6

Dodatek 2

Warunki doświadczalne badania przesiewowego układu hormonalnego ryb

1. Zalecany gatunek	(*Pimephales promelas*)	**Ryżanka japońska** (*Oryzias latipes*)	**Danio pręgowany** (*Danio rerio*)
2. Rodzaj badania	Przepływowe	Przepływowe	Przepływowe
3. Temperatura wody	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Jakość oświetlenia	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)
5. Natężenie światła	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)
6. Fotoperiod (fazy brzasku/zmierzchu są fakultatywne, nie są jednak uważane za niezbędne)	16 godzin światła, 8 godzin bez dostępu światła	12–16 godzin światła, 12–8 godzin bez dostępu światła	12–16 godzin światła, 12–8 godzin bez dostępu światła
7. Wskaźnik obciążenia	< 5 g na l	< 5 g na l	< 5 g na l
8. Wielkość komory badawczej	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Objętość roztworu do badań	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Wymiana objętości roztworów do badań	Minimum 6 razy dziennie	Minimum 5 razy dziennie	Minimum 5 razy dziennie
11. Wiek organizmów użytych do badania	Zob. pkt 20	Zob. pkt 20	Zob. pkt 20
12. Przybliżona mokra masa dorosłych ryb (g)	Samice: 1,5 ± 20 % Samce: 2,5 ± 20 %	Samice: 0,35 ± 20 % Samce: 0,35 ± 20 %	Samice: 0,65 ± 20 % Samce: 0,4 ± 20 %
13. Liczba ryb na naczynie badawcze	6 (2 samce i 4 samice)	10 (5 samców i 5 samic)	10 (5 samców i 5 samic)
14. Liczba zabiegów	= 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)	= 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)	= 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)
15. Liczba naczyń na zabieg	Minimum 4	Minimum 2	Minimum 2
16. Liczba ryb na badane stężenie	16 dorosłych samic i 8 samców (4 samice i 2 samce w każdym naczyniu z kontrpróbą)	10 dorosłych samic i 10 samców (5 samic i 5 samców w każdym naczyniu z kontrpróbą)	10 dorosłych samic i 10 samców (5 samic i 5 samców w każdym naczyniu z kontrpróbą)
17. Schemat żywienia	Żywe lub zamrożone dorosłe solowce lub naupliusy dwa lub trzy razy dziennie (bez ograniczeń), pokarm dostępny na rynku lub połączenie obu wariantów	Naupliusy solowca dwa lub trzy razy dziennie (bez ograniczeń), pokarm dostępny na rynku lub połączenie obu wariantów	Naupliusy solowca dwa lub trzy razy dziennie (bez ograniczeń), pokarm dostępny na rynku lub połączenie obu wariantów

▼**M6**

18. Napowietrzanie	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu (DO) nie spadnie poniżej 60 % nasycenia	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu (DO) nie spadnie poniżej 60 % nasycenia	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu (DO) nie spadnie poniżej 60 % nasycenia
19. Woda rozcieńczająca	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana lub odchlorowana woda wodociągowa	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana lub odchlorowana woda wodociągowa	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana lub odchlorowana woda wodociągowa
20. Okres poprzedzający narażenie	Zaleca się 7 dni	Zaleca się 7 dni	Zaleca się 7 dni
21. Czas trwania narażenia na substancję chemiczną	21 dni	21 dni	21 dni
22. Biologiczne punkty końcowe	przeżywalność zachowanie drugorzędne cechy płciowe VTG	przeżywalność zachowanie drugorzędne cechy płciowe VTG	przeżywalność zachowanie VTG
23. Akceptowalność badania	Rozpuszczony tlen > 60 % nasycenia; średnia temperatura 25 ± 2 °C; 90 % przeżywalności ryb w próbach kontrolnych; zmierzone badane stężenia w granicach 20 % średnich zmierzonych wartości na każdy poziom zabiegowy.	Rozpuszczony tlen > 60 % nasycenia; średnia temperatura 24 ± 2 °C; 90 % przeżywalności ryb w próbach kontrolnych; zmierzone badane stężenia w granicach 20 % średnich zmierzonych wartości na każdy poziom zabiegowy.	Rozpuszczony tlen > 60 % nasycenia; średnia temperatura 26 ± 2 °C; 90 % przeżywalności ryb w próbach kontrolnych; zmierzone badane stężenia w granicach 20 % średnich zmierzonych wartości na każdy poziom zabiegowy.

▼**M6**

Dodatek 3

Niektóre właściwości chemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej

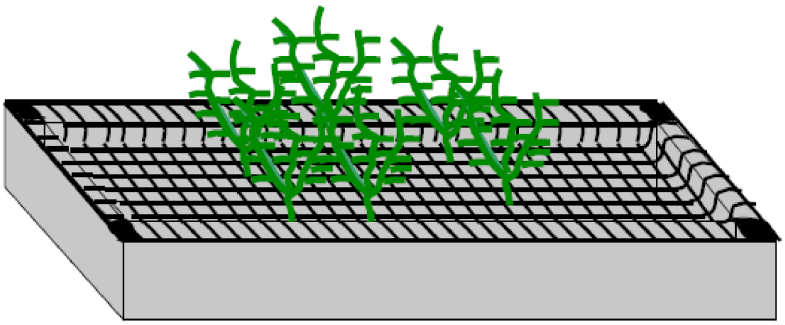
Składnik	Stężenia
Cząstki stałe	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 mg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 µg/l
Chlor resztkowy	< 10 µg/l
Pestycydy fosforoorganiczne ogółem	< 50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych plus polichlorowanych bifenyli	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l

▼M6

Dodatek 4a

Podłoże tarłowe dla danio pręgowanego

Tacka na ikrę: naczynie na narzędzia w całości wykonane ze szkła na przykład o wymiarach 22 × 15 × 5,5 cm (D × S × W), przykryte zdejmowaną pokrywą z siatki z drutu ze stali nierdzewnej (oczka o średnicy 2 mm). Siatka powinna przykrywać naczynie na narzędzia tak, aby zachodziła poniżej krawędzi.



Do siatki należy przymocować podłoże tarłowe. Powinno ono stworzyć strukturę, w którą mogą wpłynąć ryby. Odpowiednie są na przykład sztuczne rośliny akwariowe wykonane z zielonego tworzywa sztucznego (uwaga: należy uwzględnić możliwą adsorpcję badanej substancji chemicznej do tworzywa sztucznego). Należy wypłukać tworzywo sztuczne w wystarczającej ilości ciepłej wody przez wystarczająco długi czas, aby upewnić się, że żadne substancje chemiczne nie zostaną uwolnione do wody wykorzystanej do badania. W przypadku zastosowania materiałów szklanych należy dopilnować, aby ryby nie odniosły obrażeń ani nie były stłoczone w trakcie aktywności tarłowej.

Odległość między tacką i szklanymi szybkami powinna wynosić co najmniej 3 cm, aby mieć pewność, że tarło nie odbywa się poza tacą. Komórki jajowe złożone na tackę spadają przez siatkę i po upływie 45–60 minut od rozpoczęcia naświetlania można pobrać próbki. Przezroczyste komórki jajowe nie są lepkie i można je łatwo policzyć, używając światła poprzecznego. Jeżeli zastosowano pięć samic na naczynie, liczebność komórek jajowych na poziomie do 20 dziennie można uznać za niską, do 100 za średnią i powyżej 100 za wysoką. Tackę na ikrę należy wyjąć, zebrać komórki jajowe, a następnie ponownie umieścić tackę w naczyniu badawczym jak najpóźniej wieczorem albo bardzo wcześnie rano. Czas do ponownego umieszczenia tacki nie powinien przekraczać jednej godziny, w przeciwnym razie bodźce z podłoża tarłowego mogą wywołać indywidualne tarło i złożenie ikry w nietypowym czasie. Jeżeli okoliczności wymagają późniejszego wprowadzenia tacki na ikrę, należy to zrobić co najmniej 9 godzin po rozpoczęciu naświetlania. O tak później porze dnia nie można już wywołać tarła.

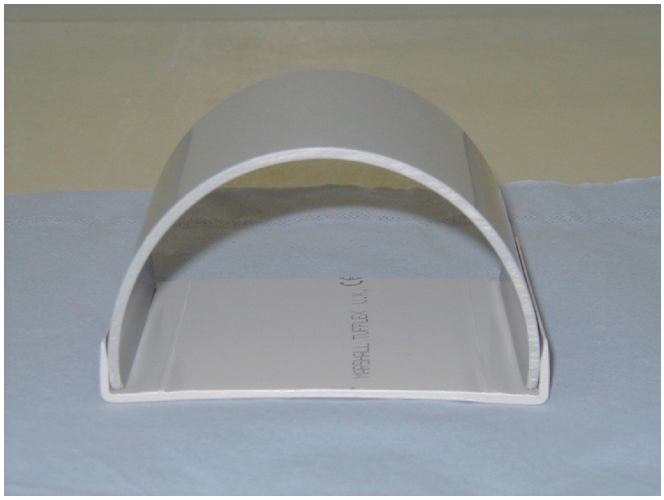
▼**M6**

Dodatek 4B

Podłoże tarłowe dla *Pimephales promelas*

Dwie lub trzy połączone płytki i tacki na ikrę wykonane z tworzywa sztucznego, ceramiczne, szklane lub ze stali nierdzewnej umieszcza się w każdej komorze badawczej (np. szara półkolista rynna o długości 80 mm umieszczona na tacce z wygiętymi krawędziami o długości 130 mm) (zob. rysunek). Wykazano, że na podłoże tarłowe nadają się odpowiednio przygotowane płytki z polichlorku winylu lub ceramiczne (Thorpe i in., 2007).

Zaleca się, aby płytki były oszlifowane, w celu zapewnienia lepszej przyczepności. Tacka powinna być również osłonięta, aby ryby nie miały dostępu do złożonej ikry, chyba że wykazano wysoką przyczepność zastosowanego podłoża tarłowego dla ikry.



Podstawę zaprojektowano tak, aby pomieściła wszystkie komórki jajowe, które nie przyczepią się do powierzchni płytki i w związku z tym spadłyby na dno zbiornika (lub komórki jajowe złożone bezpośrednio na płaską podstawę z tworzywa sztucznego). Przed zastosowaniem wszystkie podłoża tarłowe należy płukać przez co najmniej 12 godzin w wodzie rozcieńczającej.

BIBLIOGRAFIA

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

Dodatek 5 A

Ocena drugorzędnych cech płciowych u *Pimephales promelas* w celu wykrycia określonych substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego

Zarys ogólny

Potencjalnie istotne cechy wyglądu fizycznego osobników dorosłych *Pimephales promelas* w badaniu substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego obejmują zabarwienie ciała (tj. jasne/ciemne), wzór zabarwienia (tj. występowanie lub brak pionowych pręg), kształt ciała (tj. kształt głowy i obszaru piersiowego, wydęcie jamy brzusznej) i wyspecjalizowane drugorzędne cechy płciowe (tj. liczba i wielkość guzków godowych, wielkość wyściółki tłuszczowej na grzbiecie i pokładełka).

Guzki godowe znajdują się na głowie (wyściółce grzbietowej) aktywnych rozrodczo samców *Pimephales promelas* i zwykle układają się w dwustronny symetryczny wzór (Jensen i in. 2001). Samice z próby kontrolnej oraz młodociane samce i samice nie wykształcają guzków (Jensen i in. 2001). Wokół oczu i między nozdrzami samców może występować do ośmiu pojedynczych guzków. Największa liczba guzków i największe guzki są rozmieszczone w dwóch równoległych liniach tuż poniżej nozdrzy i powyżej otworu gębowego. U wielu ryb skupiska guzków występują poniżej dolnej szczęki; te, które znajdują się najbliżej otworu gębowego, zwykle występują jako pojedyncza para, zaś te znajdujące się bliżej brzucha mogą obejmować do czterech guzków. Faktyczna liczba guzków rzadko wynosi więcej niż 30 (zakres: 18–28, Jensen i in. 2001). Dominujące guzki (pod względem liczby) pojawiają się jako pojedyncze, relatywnie okrągłe struktury o wysokości w przybliżeniu równej promieniowi. U większości aktywnych rozrodczo samców przynajmniej niektóre guzki są powiększone i wyraźniejsze, tak że nie da się ich odróżnić jako pojedynczych struktur.

Niektóre rodzaje substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego mogą powodować nietypowe pojawianie się drugorzędnych cech płciowych u zwierząt przeciwnej płci; na przykład substancje będące agonistami receptorów androgenowych, takie jak 17β-metylotestosteron lub 17β-trenbolon mogą spowodować powstawanie guzków godowych u samic *Pimephales promelas* (Smith 1974; Ankley i in. 2001; 2003), zaś agonisty receptorów estrogenu mogą obniżać liczbę guzków godowych u samców (Miles-Richardson i in. 1999; Harries i in. 2000).

Poniżej znajduje się opis charakterystyki guzków godowych u *Pimephales promelas* opracowany na podstawie procedur stosowanych w laboratorium amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska w Duluth w stanie Minnesota. Poszczególne produkty lub sprzęt można zastąpić dostępnymi porównywalnymi materiałami.

Najlepszy ogląd otrzymuje się, stosując podświetlane szkło powiększające lub mikroskop stereoskopowy 3X z podświetleniem. Ryby należy oglądać od strony grzbietowej i od przodu (głową w kierunku oglądającego).

a) Umieścić rybę na małej szalce Petriego (np. o średnicy 100 mm), głową do przodu i brzuchem do dołu. Ustawić wizjer tak, aby umożliwić identyfikację guzków. Delikatnie i powoli przekręcać rybę z jednej strony na drugą, aby zidentyfikować obszary z guzkami. Policzyć i ocenić guzki.

b) Powtórzyć obserwację na powierzchni głowy po stronie brzusznej, umieszczając rybę na szalce Petriego na grzbiecie, głową do przodu.

c) Obserwacje każdej ryby powinny trwać do 2 minut.

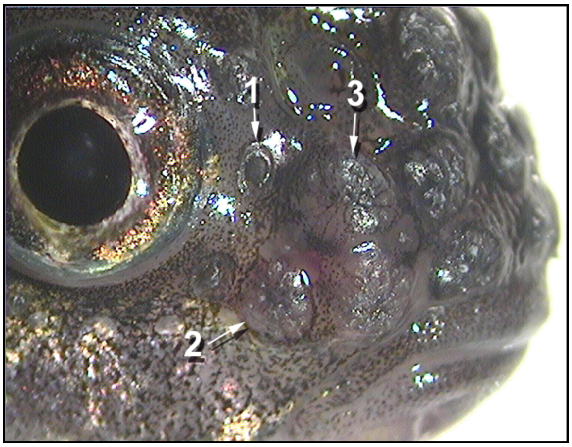
▼M6

Liczenie i ocena guzków

Zidentyfikowano sześć konkretnych obszarów do oceny występowania i rozwoju guzków u osobników dorosłych *Pimephales promelas*. Opracowano szablon do określenia miejsca i liczby występujących guzków (zob. część końcowa niniejszego dodatku). Odnotowuje się liczbę guzków, a ich wielkość można ocenić ilościowo dla każdego organizmu w następujący sposób: 0 – brak, 1 – występują, 2 – powiększone i 3 – wyraźne (rys. 1).

Ocena 0 – brak jakichkolwiek guzków. Ocena 1 – występują; identyfikacja jakichkolwiek guzków z pojedynczym punktem, którego wysokość jest niemal równa promieniowi (średnicy). Ocena 2 – powiększone; identyfikacja tkanki przypominającej wyglądem gwiazdkę, zwykle mające duży promień podstawy oraz wyżłobienia lub bruzdy wychodzące ze środka. Wysokość guzka jest zwykle bardziej nieregularna, czasami może on być jednak lekko zaokrąglony. Ocena 3 – wyraźne; guzki są zwykle dość duże i zaokrąglone, o mniej określonej strukturze. Niekiedy guzki będą występowały razem, tworząc jednolitą masę wzdłuż jednego obszaru lub kilku obszarów (B, C i D, opisane poniżej). Zabarwienie i wzór są podobne jak w ocenie 2, czasami jednak trudno je rozróżnić. Zastosowanie tego systemu oceny zwykle prowadzi do otrzymania łącznej oceny guzków wynoszącej < 50 u normalnych samców z próby kontrolnej posiadających 18–20 guzków (Jensen i in. 2001).

Rysunek 1



Faktyczna liczba guzków u niektórych ryb może być większa niż liczba rubryk w szablonie (dodatek A) dla danego obszaru oceny. Jeżeli tak się stanie, dodatkowe punkty oceny można zaznaczyć w rubryce lub na prawo lub na lewo od niej. Szablon nie musi być zatem symetryczny. Dodatkową techniką mapowania guzków, które są połączone w pary lub połączone pionowo wzdłuż poziomej płaszczyzny otworu gębowego, może być podwójne zaznaczanie dwóch punktów oceny guzków w jednej rubryce.

Obszary oznaczania:

A – Guzki zlokalizowane wokół oka. Oznaczanie od strony grzbietowej do strony brzusznej wokół przedniej krawędzi oka. Licznie i powszechnie występują u dorosłych samców z próby kontrolnej, nie występują u samic z próby kontrolnej, a u samic narażonych na działanie androgenów zwykle występują w parach (po jednej w pobliżu każdego oka) lub pojedynczo.

B – Guzki zlokalizowane między nozdrzami (porami kanałów sensorycznych). Zwykle występują w parach u samców z próby kontrolnej na wyższych poziomach (2 – powiększone lub 3 – wyraźne). Nie występują u samic z próby kontrolnej, u samic narażonych na działanie androgenów występują i rozwijają się w pewnym stopniu.

C – Guzki zlokalizowane bezpośrednio z przodu nozdrzy, równolegle do otworu gębowego. Zwykle są powiększone lub wyraźne u dojrzałych samców z próby kontrolnej. Występują lub są powiększone u mniej rozwiniętych samców lub samic poddanych działaniu androgenów.

▼M6

D – Guzki zlokalizowane równolegle wzdłuż linii otworu gębowego. Zwykle oceniane jako rozwinięte u samców z próby kontrolnej. Brak u samic z próby kontrolnej, ale występują u samic narażonych na działanie androgenów.

E – Guzki zlokalizowane na dolnej szczęce, w pobliżu otworu gębowego, zwykle niewielkie i często występujące w parach. Różne u samców z próby kontrolnej lub badanej i samic z próby badanej.

F – Guzki zlokalizowane po stronie brzusznej w kierunku E. Zwykle małe i występujące w parach. Występują u samców z próby kontrolnej i samic poddanych działaniu androgenów.

BIBLIOGRAFIA

(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.

Szablon dot. guzków

Nr _____

Data _____

Suma ocen _____

Skala numeryczna

1 – występują

2 – powiększone

3 – wyraźne

	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

Dodatek 5 B

Ocena drugorzędnych cech płciowych u ryżanki w celu wykrycia określonych substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego

Poniżej opisano procedurę pomiaru procesów tworzenia się brodawek (*), które stanowią drugorzędne cechy płciowe u ryżanki (*Oryzias latipes*).

(*) Procesy tworzenia się brodawek zwykle zachodzą wyłącznie u dorosłych samców na promieniach płetw od drugiego do siódmego lub ósmego, licząc od tylnego końca płetwy odbytowej (rys. 1 i 2). Procesy te rzadko zachodzą jednak na pierwszym promieniu płetwy od tylnego końca płetwy odbytowej. Niniejsza standardowa procedura operacyjna obejmuje pomiar procesów na pierwszym promieniu płetwy (numer promienia płetwy w niniejszej procedurze odpowiada ich kolejności, począwszy od tylnego końca płetwy odbytowej).

1) Po wycięciu wątroby (dodatek 6) zwłoki umieszcza się w probówce stożkowej zawierającej około 10 ml 10 % obojętnej buforowanej formaliny (głową do góry i ogonem do dołu). Jeżeli gonada jest utrwalona w roztworze innym niż 10 % obojętna buforowana formalina, wykonać poprzeczne nacięcie zwłok między przednim obszarem płetwy odbytowej a odbytem za pomocą ostrza, uważając, aby nie uszkodzić gonopora i samej gonady (rys. 3). Umieścić ciało ryby od strony czaszki w roztworze utrwalającym w celu utrwalenia gonady, zaś stronę ogonową – w 10 % obojętnej buforowanej formalinie, jak opisano powyżej.

2) Po umieszczeniu ciała ryby w 10 % obojętnej buforowanej formalinie chwycić przedni obszar płetwy odbytowej pęsetą i złożyć ją na około 30 sekund, tak aby płetwa odbytowa pozostała otwarta. Chwytając płetwę odbytową pęsetą, ostrożnie złapać kilka promieni płetwy w przednim obszarze, uważając, aby nie zeskrobać procesów tworzenia się brodawek.

3) Po utrzymywaniu otwartej płetwy odbytowej przez około 30 sekund ciało ryby należy umieścić w 10 % obojętnej buforowanej formalinie w temperaturze pokojowej do czasu dokonania pomiaru procesów tworzenia się brodawek (pomiar należy przeprowadzić po utrwalaniu przez co najmniej 24 godziny).

Pomiar

1) Po utrwalaniu ciała ryby w 10 % obojętnej buforowanej formalinie przez co najmniej 24 godziny wyjąć zwłoki ryby z probówki stożkowej i wytrzeć formalinę bibułą filtracyjną (lub ręcznikiem papierowym).

2) Położyć rybę stroną brzuszną do góry. Następnie ostrożnie odciąć płetwę odbytową za pomocą małych nożyczek chirurgicznych (zaleca się odcięcie płetwy odbytowej wraz z niewielką ilością pterygioforu).

3) Chwycić przedni obszar odciętej płetwy odbytowej pęsetą i umieścić na szkiełku z kilkoma kroplami wody. Następnie przykryć płetwę odbytową szkiełkiem nakrywkowym. Należy zachować ostrożność, aby nie zeskrobać procesów tworzenia się brodawek podczas chwytania płetwy odbytowej pęsetą.

4) Policzyć płytki łączące, na których zachodzą procesy tworzenia się brodawek, za pomocą licznika pod mikroskopem biologicznym (mikroskopem dolnostolikowym lub odwróconym). Uznaje się, że zachodzą procesy tworzenia się brodawek, jeśli ich niewielkie skupisko jest widoczne na tylnym obrzeżu płytki łączącej. Zapisać liczbę płytek łączących, na których

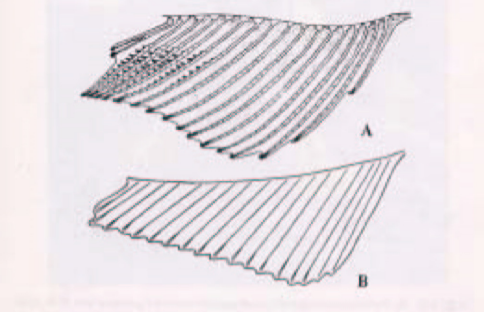
▼M6

zachodzą procesy tworzenia się brodawek dla każdego promienia płetwy w karcie badania (np. pierwszy promień płetwy: 0, drugi promień płetwy: 10, trzeci promień płetwy: 12 itd.) i wpisać sumę tych liczb dla poszczególnych ryb do arkusza kalkulacyjnego Excel. W razie potrzeby zrobić zdjęcie płetwy odbytowej i policzyć na zdjęciu liczbę płytek łączących, na których zachodzą procesy tworzenia się brodawek.

5) Po dokonaniu pomiaru umieścić płetwę odbytową w probówce stożkowej opisanej w (1) i zachować.

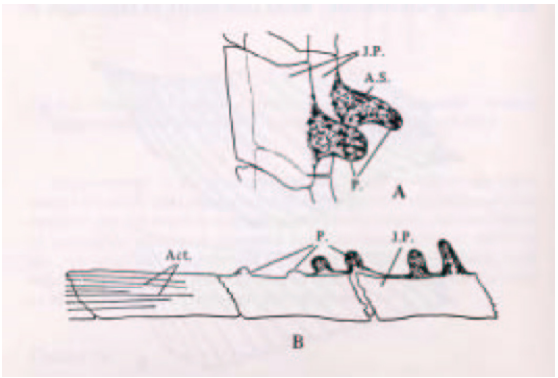
Rys.1.

Schemat przedstawiający różnice w kształcie i wielkości płetwy odbytowej pomiędzy płciami. A – samiec, B – samica. 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.



Rys. 2

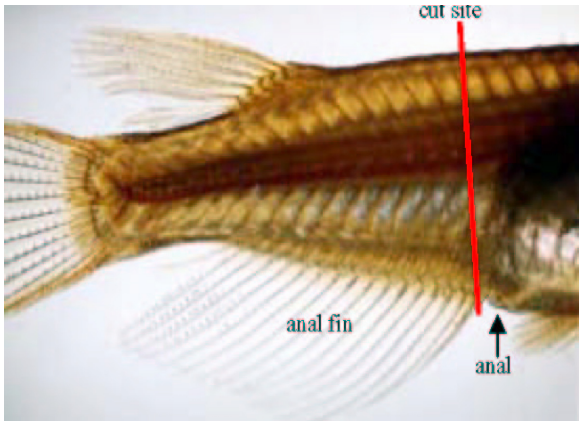
A – procesy zachodzące na płytkach łączących promienia płetwy odbytowej. J.P. – płytka łącząca (ang. *joint plate*); A.S. – przestrzeń między osiami (ang. *axial space*); P. – proces. B – tylny koniec promienia płetwy. Actinotrichia (Act.) znajdują się na zakończeniu. Oka, T. B., 1931. On the processes 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

Rys. 3.

Zdjęcie ciała ryby przedstawiające miejsce odcięcia, w przypadku gdy gonada jest utrwalona w roztworze utrwalającym innym niż 10 % obojętna buforowana formalina. W takim przypadku pozostała część ciała zostanie odcięta pomiędzy przednim obszarem płetwy odbytowej a odbytem za pomocą ostrza (czerwony pasek); część ciała ryby z głową zostanie umieszczona w roztworze utrwalającym dla gonad, natomiast część ciała ryby z ogonem zostanie umieszczona w 10 % obojętnej buforowanej formalinie.



▼M6

Dodatek 6

Zalecane procedury pobierania próbek do celów analizy witellogeniny

Należy starać się zapobiegać zanieczyszczeniu krzyżowemu między próbkami VTG pobranymi od samców i samic.

Procedura 1A: *Pimephales promelas*, pobieranie krwi z żyły/tętnicy ogonowej

Po znieczuleniu trzon ogona nacina się częściowo ostrzem skalpela i pobiera się krew z żyły/tętnicy ogonowej za pomocą kapilary mikrohematokrytowej powlekanej heparyną. Po pobraniu krwi szybko izoluje się osocze przez odwirowanie przy 15 000 g przez 3 minuty (lub ewentualnie przy 15 000 g przez 10 minut w temperaturze 4 °C). W razie potrzeby po odwirowaniu można oznaczyć hematokryt wyrażony w procentach. Następnie usuwa się osocze z kapilary mikrohematokrytowej i przechowuje w probówce do wirówki z 0,13 jednostki aprotyniny (inhibitor proteaz) w temperaturze – 80 °C, do czasu aż będzie można oznaczyć poziom witellogeniny. W zależności od wielkości *Pimephales promelas* (która jest zależna od płci) objętość osocza, jaką można pobrać, wynosi zwykle 5–60 mikrolitrów na rybę (Jensen i in. 2001).

Procedura 1B: *Pimephales promelas*, pobieranie krwi z serca

Krew można również ewentualnie pobrać przez nakłucie serca za pomocą heparynizowanej strzykawki (1 000 jednostek heparyny na ml). Krew przenosi się następnie do probówek Eppendorfa (trzymanych na lodzie) a następnie odwirowuje (5 min, 7 000 g, temperatura pokojowa). Osocze należy przenieść do czystych probówek Eppendorfa (w podwielokrotnościach, jeżeli pozwala na to objętość osocza) i niezwłocznie zamrozić w temperaturze – 80 °C do czasu przeprowadzenia analizy (Panter i in., 1998).

Procedura 2 A: Ryżanka japońska, wycięcie wątroby u ryżanki

Wyjęcie ryb przeznaczonych do badania z komory badawczej

1) Ryby przeznaczone do badania należy wyjąć z komory badawczej za pomocą małego podbieraka. Należy uważać, aby nie wrzucić ryb przeznaczonych do badania do innych komór badawczych.

2) Zasadniczo ryby przeznaczone do badania należy wyjmować w następującej kolejności: próba kontrolna, próba kontrolna z rozpuszczalnikiem (w stosownych przypadkach), próba z najniższym stężeniem, próba ze średnim stężeniem, próba z najwyższym stężeniem, próba z kontrolą dodatnią. Ponadto z jednej komory badawczej należy najpierw wyjąć wszystkie samce, a dopiero potem samice.

3) Płeć każdej z ryb przeznaczonych do badania identyfikuje się na podstawie zewnętrznych drugorzędnych cech płciowych (np. kształtu płetwy odbytowej).

4) Rybę przeznaczoną do badania umieścić w pojemniku transportowym i przenieść do stanowiska badawczego w celu wycięcia wątroby. Sprawdzić poprawność etykiet komory badawczej i pojemnika transportowego oraz potwierdzić, że liczba ryb wyjętych z komory badawczej i liczba ryb pozostających w komorze jest zgodna z oczekiwaniami.

5) Jeżeli nie można zidentyfikować płci na podstawie wyglądu zewnętrznego ryby, wyjąć wszystkie ryby z komory badawczej. W takim przypadku płeć należy określić przez obserwację gonad lub drugorzędnych cech płciowych pod mikroskopem stereoskopowym.

▼**M6**

Wycięcie wątroby

1) Przenieść ryby przeznaczone do badania z pojemnika transportowego do roztworu środka znieczulającego za pomocą małego podbieraka.

2) Po znieczuleniu przenieść ryby przeznaczone do badania na bibułę filtracyjną (lub ręcznik papierowy) za pomocą pęsety (typu ogólnodostępnego). Chwytając ryby przeznaczone do badania, przyłożyć pęsetę do boków głowy, aby zapobiec złamaniu ogona.

3) Wytrzeć wodę z powierzchni ryb bibułą filtracyjną (lub ręcznikiem papierowym).

4) Położyć rybę stroną brzuszną do góry. Następnie wykonać małe poprzeczne nacięcie w połowie odległości między brzusznym obszarem szyjnym a środkowym obszarem brzusznym za pomocą nożyczek chirurgicznych.

5) Włożyć nożyczki chirurgiczne do niewielkiego nacięcia i rozciąć jamę brzuszną od punktu ogonowego w kierunku pokrywy skrzelowej do odbytu od strony czaszki wzdłuż środkowej linii jamy brzusznej. Należy uważać, aby nie włożyć nożyczek chirurgicznych zbyt głęboko i nie uszkodzić wątroby i gonady.

6) Przeprowadzić następujące czynności pod mikroskopem stereoskopowym.

7) Położyć rybę przeznaczoną do badania stroną brzuszną do góry na ręczniku papierowym (można również wykorzystać szklaną szalkę Petriego lub szkiełko).

8) Rozszerzyć ściany jamy brzusznej pęsetą precyzyjną i wyciągnąć organy wewnętrzne na zewnątrz. W razie potrzeby dopuszcza się również wyjęcie organów wewnętrznych przez usunięcie ściany jamy brzusznej z jednej strony.

9) Odsłonić połączoną część wątroby i pęcherzyka żółciowego za pomocą drugiej pęsety precyzyjnej. Następnie chwycić przewód żółciowy i odciąć pęcherzyk żółciowy. Należy uważać, aby nie przerwać ściany pęcherzyka żółciowego.

10) Chwycić przełyk i odciąć przewód pokarmowy od wątroby w ten sam sposób. Należy uważać, aby zawartość przewodu pokarmowego nie rozlała się. Odciąć ogonową część przewodu pokarmowego od odbytu i usunąć przewód z jamy brzusznej.

11) Odciąć pas tłuszczu i innych tkanek od brzegów wątroby. Należy uważać, aby nie zadrapać wątroby.

12) Chwycić za przestrzeń wrotną wątroby za pomocą pęsety precyzyjnej i wyjąć wątrobę z jamy brzusznej.

13) Położyć wątrobę na szkiełku. W razie potrzeby należy usunąć z powierzchni wątroby dodatkowy tłuszcz i tkankę obcą (np. powłoki jamy brzusznej) za pomocą pęsety precyzyjnej.

14) Zmierzyć masę wątroby wraz z mikroprobówką o pojemności 1,5 ml jako tarą za pomocą elektronicznej wagi analitycznej. Odnotować wartość w karcie badania (odczyt z dokładnością do 0,1 mg). Potwierdzić informacje dotyczące identyfikacji na etykiecie umieszczonej na mikroprobówce.

15) Zamknąć mikroprobówkę z wątrobą. Przechowywać ją na statywie chłodzącym (lub w pudełku z lodem).

16) Po wycięciu jednej wątroby wyczyścić narzędzia chirurgiczne albo wymienić je na czyste.

▼M6

17) Wyciąć wątroby wszystkich ryb znajdujących się w pojemniku transportowym zgodnie z powyższym opisem.

18) Po wycięciu wątrób ze wszystkich ryb znajdujących się w pojemniku transportowym (tj. wszystkich samców lub samic w komorze badawczej) umieścić wszystkie próbki wątroby na statywie z probówkami opatrzonymi etykietą do celów identyfikacji i przechowywać w zamrażarce. W przypadku gdy wątroby przekazuje się do obróbki wstępnej niedługo po wycięciu, przenosi się je do kolejnego stanowiska badawczego na statywie chłodzącym (lub w pudełku z lodem).

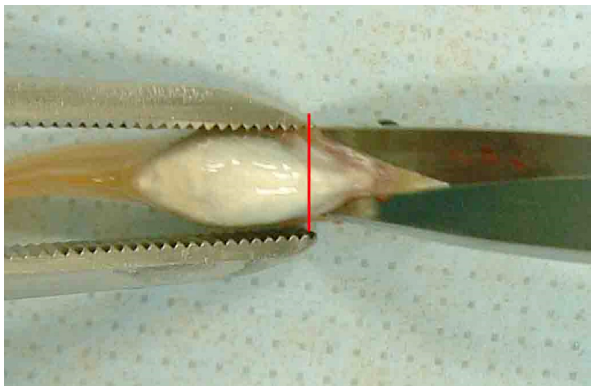
Po wycięciu wątroby można wykonać pomiar drugorzędnych cech płciowych ryb.

Próbka

Przechowywać próbki wątroby pobrane z ryb przeznaczonych do badania w temperaturze ≤ – 70 °C, jeżeli nie wykorzystuje się ich do obróbki wstępnej niedługo po wycięciu.

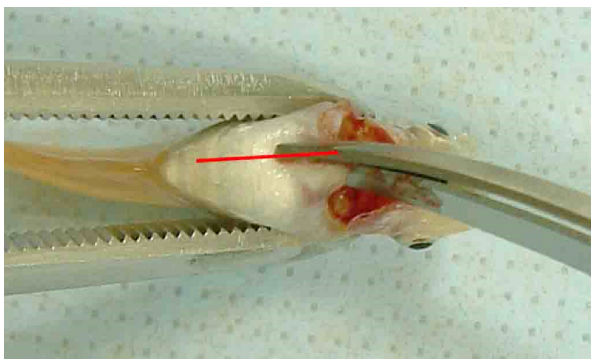
Rys. 1

Nacięcie nożyczkami wykonuje się tuż przed płetwami piersiowymi.



Rys. 2

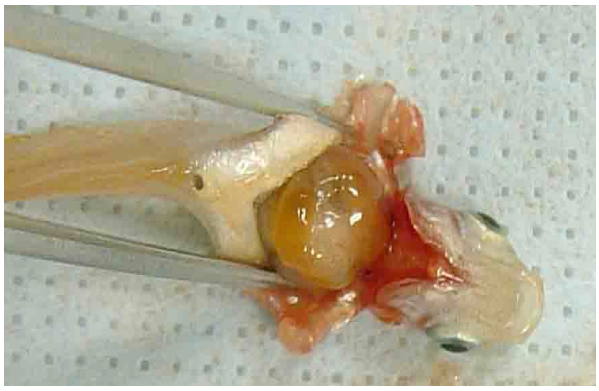
Środkową linię brzucha nacina się nożyczkami do punktu znajdującego się około 2 mm od odbytu w kierunku czaszki.



▼M6

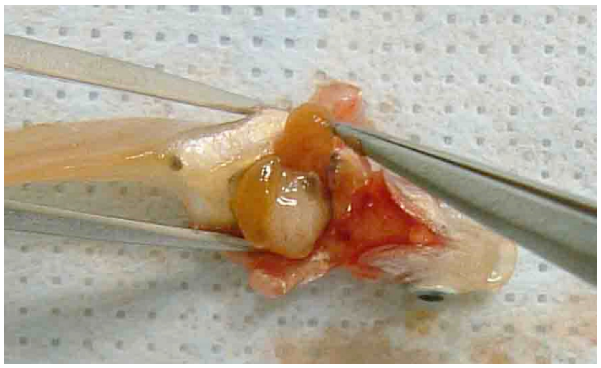
Rys. 3

Ściany jamy brzusznej rozszerza się szczypczykami w celu odsłonięcia wątroby i innych organów wewnętrznych. (Ewentualnie można przytrzymać ściany jamy brzusznej po bokach).



Rys. 4

Wątrobę wyraźnie się izoluje i wycina za pomocą szczypczyków.



Rys. 5

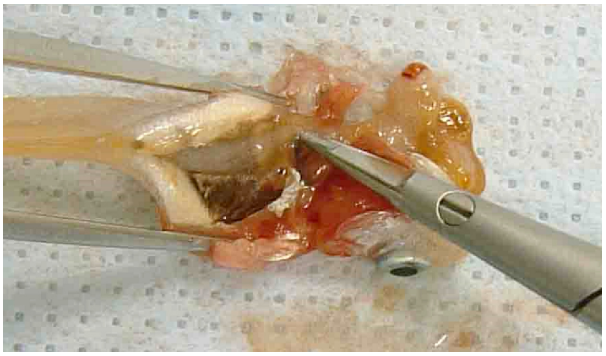
Jelita delikatnie wyciąga się za pomocą szczypczyków.



▼M6

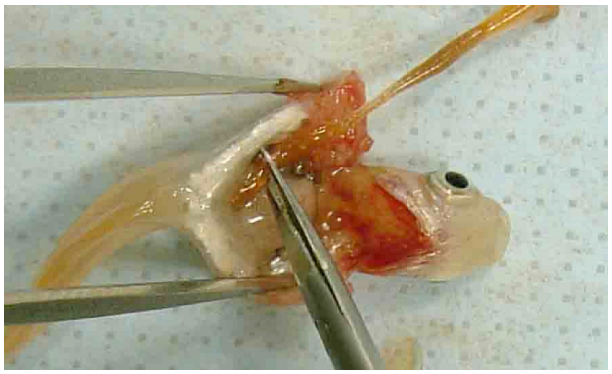
Rys. 6

Oba końce jelit i wszelkie przyczepy krezki odcina się za pomocą nożyczek.



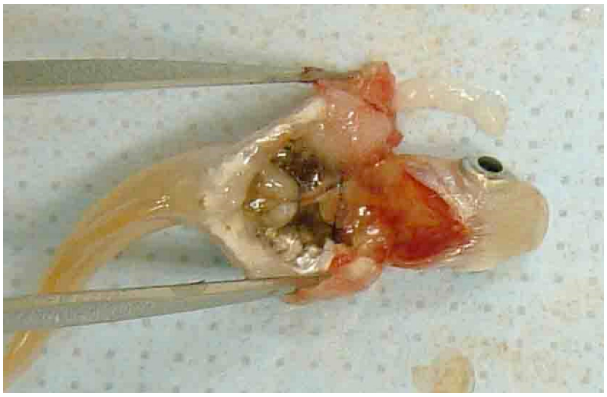
Rys. 7 (samica)

W przypadku samicy stosuje się identyczną procedurę.



Rys. 8

Koniec procedury.



Procedura 2 B: Ryżanka japońska (*Oryzias latipes*), obróbka wstępna wątroby przed analizą poziomu witellogeniny.

Wziąć butelkę z roztworem buforowym do homogenizacji z zestawu ELISA i schłodzić ją kruszonym lodem (temperatura roztworu: ≤ 4 °C). W przypadku zastosowania roztworu buforowego do homogenizacji z układu EnBio ELISA rozmrozić roztwór w temperaturze pokojowej, a następnie schłodzić butelkę kruszonym lodem.

▼**M6**

Obliczyć objętość roztworu buforowego do homogenizacji wątroby na podstawie jej masy (dodając 50 µl roztworu buforowego do homogenizacji na 1 mg masy wątroby do homogenatu). Na przykład jeżeli masa wątroby wynosi 4,5 mg, objętość roztworu buforowego do homogenizacji wątroby wynosi 225 µl. Przygotować listę objętości roztworu buforowego do homogenizacji dla wszystkich wątrób.

Przygotowanie wątroby do obróbki wstępnej

1) Bezpośrednio przed rozpoczęciem obróbki wstępnej wyjąć z zamrażarki mikroprobówkę o pojemności 1,5 ml zawierającą wątrobę.

2) Obróbkę wstępną wątroby pobranej od samców należy przeprowadzać przed obróbką wstępną wątroby pobranej od samic, aby zapobiec zanieczyszczeniu witellogeniną. Ponadto obróbkę wstępną badanych grup należy przeprowadzać w następującej kolejności: próba kontrolna, próba kontrolna z rozpuszczalnikiem (w stosownych przypadkach), próba z najniższym stężeniem, próba ze średnim stężeniem, próba z najwyższym stężeniem, próba z kontrolą dodatnią.

3) Liczba mikroprobówek o pojemności 1,5 ml z próbkami wątroby, wyjętych jednorazowo z zamrażarki, nie powinna przekraczać liczby, którą można odwirować w tym samym czasie.

4) Ułożyć mikroprobówki o pojemności 1,5 ml z próbkami wątroby na statywie chłodzącym w kolejności według numeru próbki (nie ma potrzeby rozmrażania wątroby).

Obróbka wstępna

1. Dodanie roztworu buforowego do homogenizacji

   1) Sprawdzić na liście, jaką objętość roztworu buforowego do homogenizacji należy zastosować w przypadku danej próbki wątroby, i wyregulować mikropipetę (zakres objętości: 100–1 000 µl) do odpowiedniej objętości. Przymocować czystą końcówkę do mikropipety.

   2) Pobrać roztwór buforowy do homogenizacji z butelki z odczynnikiem i dodać bufor do mikroprobówki o pojemności 1,5 ml zawierającej wątrobę.

   3) Dodać roztwór buforowy do homogenizacji do wszystkich mikroprobówek o pojemności 1,5 ml zawierających wątrobę zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Nie ma potrzeby zmieniać końcówki mikropipety na nową. Jeżeli jednak końcówka jest zanieczyszczona lub podejrzewa się, że jest zanieczyszczona, należy ją wymienić.

2. Homogenizacja wątroby

   1) Przymocować nowy tłuczek do homogenizacji do homogenizatora do mikroprobówek.

   2) Włożyć tłuczek do mikroprobówki o pojemności 1,5 ml. Przytrzymać homogenizator do mikroprobówek w taki sposób, aby zgnieść wątrobę między powierzchnią tłuczka a wewnętrzną ścianą mikroprobówki o pojemności 1,5 ml.

   3) Uruchomić homogenizator do mikroprobówek na 10–20 sekund. W tym czasie chłodzić mikroprobówkę o pojemności 1,5 ml kruszonym lodem.

   4) Wyjąć tłuczek z mikroprobówki o pojemności 1,5 ml i odstawić ją na około 10 sekund. Następnie przeprowadzić kontrolę wzrokową stanu zawiesiny.

   5) Jeżeli w zawiesinie widoczne są kawałki wątroby, powtórzyć działania (3) i (4), aby otrzymać zadowalający homogenat wątroby.

▼**M6**

6) Zawiesinę homogenatu wątroby chłodzić na statywie z lodem do czasu odwirowania.

7) Do sporządzenia każdego homonegatu użyć nowego tłuczka.

8) Przeprowadzić homogenizację wszystkich wątrób z roztworem buforowym do homogenizacji zgodnie z opisaną wyżej procedurą.

3. Odwirowanie zawiesiny homogenatu wątroby

1) Upewnić się, że temperatura schłodzonej komory wirówki wynosi ≤ 5 °C.

2) Włożyć mikroprobówki o pojemności 1,5 ml zawierające zawiesinę homogenatu wątroby do schłodzonej wirówki (w razie potrzeby wyważając).

3) Odwirować zawiesinę homogenatu wątroby przy 13 000 g przez 10 min w temperaturze ≤ 5 °C. Jeżeli jednak supernatanty są właściwie oddzielone, moc i czas odwirowania można dostosować według potrzeb.

4) Po odwirowaniu sprawdzić, czy supernatanty są odpowiednio oddzielone (powierzchnia: lipid, warstwa pośrednia: supernatant, warstwa dolna: tkanka wątroby). Jeżeli oddzielenie nie jest odpowiednie, ponownie odwirować zawiesinę w tych samych warunkach.

5) Wyjąć wszystkie próbki ze schładzanej wirówki i ułożyć je na statywie z lodem w kolejności według numeru próbki. Należy uważać, aby po odwirowaniu żadna z oddzielonych warstw nie zawiesiła się ponownie.

4. Zbieranie supernatantu

1) Umieścić cztery mikroprobówki do przechowywania supernatantu o pojemności 0,5 ml na statywie na probówki.

2) Zebrać 30 µl każdego supernatantu (oddzielonego jako warstwa pośrednia) za pomocą mikropipety i wprowadzić do jednej mikroprobówki o pojemności 0,5 ml. Należy uważać, aby nie zebrać lipidu z powierzchni ani tkanki wątroby z warstwy dolnej.

3) Zebrać supernatant i wprowadzić do pozostałych dwóch mikroprobówek o pojemności 0,5 ml w sposób opisany powyżej.

4) Zebrać pozostałą część supernatantu za pomocą mikropipety (jeżeli jest to możliwe: ≥ 100 µl). Następnie wprowadzić supernatant do ostatniej mikroprobówki o pojemności 0,5 ml. Należy uważać, aby nie zebrać lipidu z powierzchni ani tkanki wątroby z warstwy dolnej.

5) Zamknąć mikroprobówkę o pojemności 0,5 ml i zapisać na etykiecie objętość supernatantu. Następnie natychmiast schłodzić mikroprobówki na statywie z lodem.

6) W przypadku każdego supernatantu wymienić końcówkę mikropipety na nową. Jeżeli do końcówki przyczepi się duża ilość lipidu, należy natychmiast wymienić ją na nową, aby zapobiec zanieczyszczeniu wyciągu z wątroby tłuszczem.

7) Cały odwirowany supernatant wprowadzić do czterech mikroprobówek o pojemności 0,5 ml zgodnie z wyżej opisaną procedurą.

▼M6

8) Po wprowadzeniu supernatantu do mikroprobówek o pojemności 0,5 ml umieścić je wszystkie na statywie na probówki z etykietą identyfikacyjną, a następnie natychmiast zamrozić w zamrażarce. Jeżeli stężenia VTG mierzy się natychmiast po obróbce wstępnej, należy schłodzić jedną mikroprobówkę o pojemności 0,5 ml (zawierającą 30 µl supernatantu) na statywie na probówki i przenieść do stanowiska badawczego, gdzie przeprowadza się test ELISA. W takim przypadku umieścić pozostałe mikroprobówki na statywach na probówki i zamrozić w zamrażarce.

9) Po zebraniu supernatantu odrzucić pozostałości.

Przechowywanie próbki

Przechowywać mikroprobówki o pojemności 0,5 ml zawierające supernatant z homogenatu wątroby w temperaturze ≤ – 70 °C do czasu wykorzystania ich w teście ELISA.

Procedura 3 A: Danio pręgowany, pobieranie krwi z żyły/tętnicy ogonowej

Natychmiast po znieczuleniu trzon ogona nacina się poprzecznie i pobiera się krew z żyły/tętnicy ogonowej za pomocą kapilary mikrohematokrytowej powlekanej heparyną. Objętość krwi wynosi 5–15 µl, w zależności od wielkości ryby. Do mikrokapilary dodaje się taką samą objętość roztworu buforowego aprotyniny (6 µgml w PBS), a osocze oddziela się od krwi przez odwirowanie (5 minut przy 600 g). Osocze zbiera się w probówkach badawczych i przechowuje w temperaturze – 20 °C do czasu przeprowadzenia analizy witellogeniny i innych białek, które są przedmiotem zainteresowania.

Procedura 3 B: Danio pręgowany; pobranie krwi przez nakłucie serca

Aby zapobiec krzepnięciu krwi i degradacji białek, próbki pobiera się w roztworze chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) zawierającym heparynę (1 000 jednostek/ml) i inhibitor proteaz aprotyninę (2 TIU/ml). Zaleca się, aby roztwór buforowy składał się z soli amonowej heparyny i liofilizowanej aprotyniny. Do pobierania próbek krwi zaleca się używanie strzykawki (1 ml) z cienką igłą (np. Braun Omnikan-F). Strzykawkę należy wstępnie napełnić roztworem buforowym (w przybliżeniu 100 µl), aby w pełni eluować niewielkie objętości krwi z każdej ryby. Próbki krwi pobiera się przez punkcję serca. Na początku rybę należy znieczulić za pomocą MS-222 (100 mg/l). Dzięki podaniu znieczulenia w odpowiedni sposób można rozpoznać bicie serca danio pręgowanego. Podczas nakłuwania serca delikatnie naciskać tłok strzykawki. Zakres objętości krwi do pobrania wynosi 20–40 mikrolitrów. Po nakłuciu serca wypełnić probówkę mieszaniną krwi i roztworu buforowego. Osocze oddziela się od krwi przez odwirowanie (20 min.; 5 000 g) i należy je przechowywać w temperaturze – 80 °C do czasu, aż będzie potrzebne do analizy.

Procedura 3C: Standardowa procedura operacyjna: danio pręgowany, homogenizacja głowy i ogona

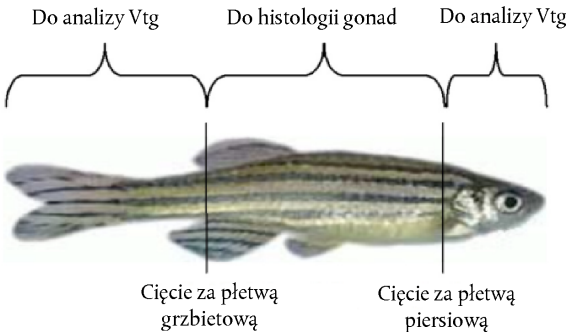
1) Ryby znieczula się i usypia zgodnie z opisem badania.

2) Głowę i ogon odcina się od ryby zgodnie z rys. 1.

Uwaga: Przyrządy do przeprowadzania sekcji i deskę do krojenia należy wypłukać i odpowiednio wyczyścić (np. za pomocą 96 % etanolu) przed obróbką każdej ryby w celu uniknięcia przeniesienia „zanieczyszczenia witellogeniną” z samic lub samców, u których VTG występuje, na samce, u których ona nie występuje.

▼**M6**

Rysunek 1



3) Łączną masę głowy i ogona każdej z ryb mierzy się z dokładnością do pełnego miligrama.

4) Po zważeniu tych części umieszcza się je w odpowiednich probówkach (np. probówkach Eppendorfa o pojemności 1,5 ml) i zamraża w temperaturze – 80 °C do czasu homogenizacji albo bezpośrednio poddaje homogenizacji z lodem za pomocą dwóch tłuczków z tworzywa sztucznego. (Zastosować można również inne metody, pod warunkiem że stosując je, używa się lodu, i można uzyskać jednorodną masę). Uwaga: Probówki należy odpowiednio ponumerować, aby głowa i ogon danej ryby mogły zostać przypisane do odpowiadających im części ciała wykorzystywanych do histologii gonad.

5) Po uzyskaniu jednorodnej masy dodaje się 4-krotność wagi tkanki lodowatego roztworu buforowego do homogenizacji (*). Mieszaninę należy dalej rozdrabniać za pomocą tłuczków, dopóki nie stanie się jednorodna. Ważna uwaga: W przypadku każdej ryby wykorzystuje się nowe tłuczki.

6) Próbki umieszcza się z lodem aż do odwirowania w temp. 4 °C przy 50 000 × g przez 30 min.

7) Użyć pipety do wprowadzenia porcji supernatantu o objętości 20 µl do co najmniej dwóch probówek przez zanurzenie końcówki pipety pod znajdującą się na wierzchu warstwę tłuszczu i ostrożne zassanie supernatantu bez fragmentów tłuszczu lub grudek.

8) Do momentu wykorzystania probówki przechowuje się w temperaturze – 80 °C.

(*) **Roztwór buforowy do homogenizacji:**

— 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % koktajl inhibitorów proteaz (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl koktajlu inhibitorów proteaz.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), np. firmy Bie & Berntsen, Dania.

— Koktajl inhibitorów proteaz: firmy Sigma (w przypadku tkanki ssaków), numer produktu P 8340.

— *Uwaga:* Roztwór buforowy do homogenizacji należy wykorzystać w tym samym dniu, w którym został wyprodukowany. Podczas stosowania należy umieścić go w lodzie.

▼**M6**

Dodatek 7

Próbki wzmocnione witellogeniny i międzylaboratoryjny wzorzec referencyjny

Każdego dnia, w którym przeprowadza się badania witellogeniny, zostanie przeanalizowana próbka wzmocniona przygotowana z zastosowaniem międzylaboratoryjnego wzorca referencyjnego. Witellogenina wykorzystana do przygotowania międzylaboratoryjnego wzorca referencyjnego będzie pochodzić z innej partii niż partia wykorzystana do przygotowania wzorców kalibracyjnych w odniesieniu do przeprowadzanego badania.

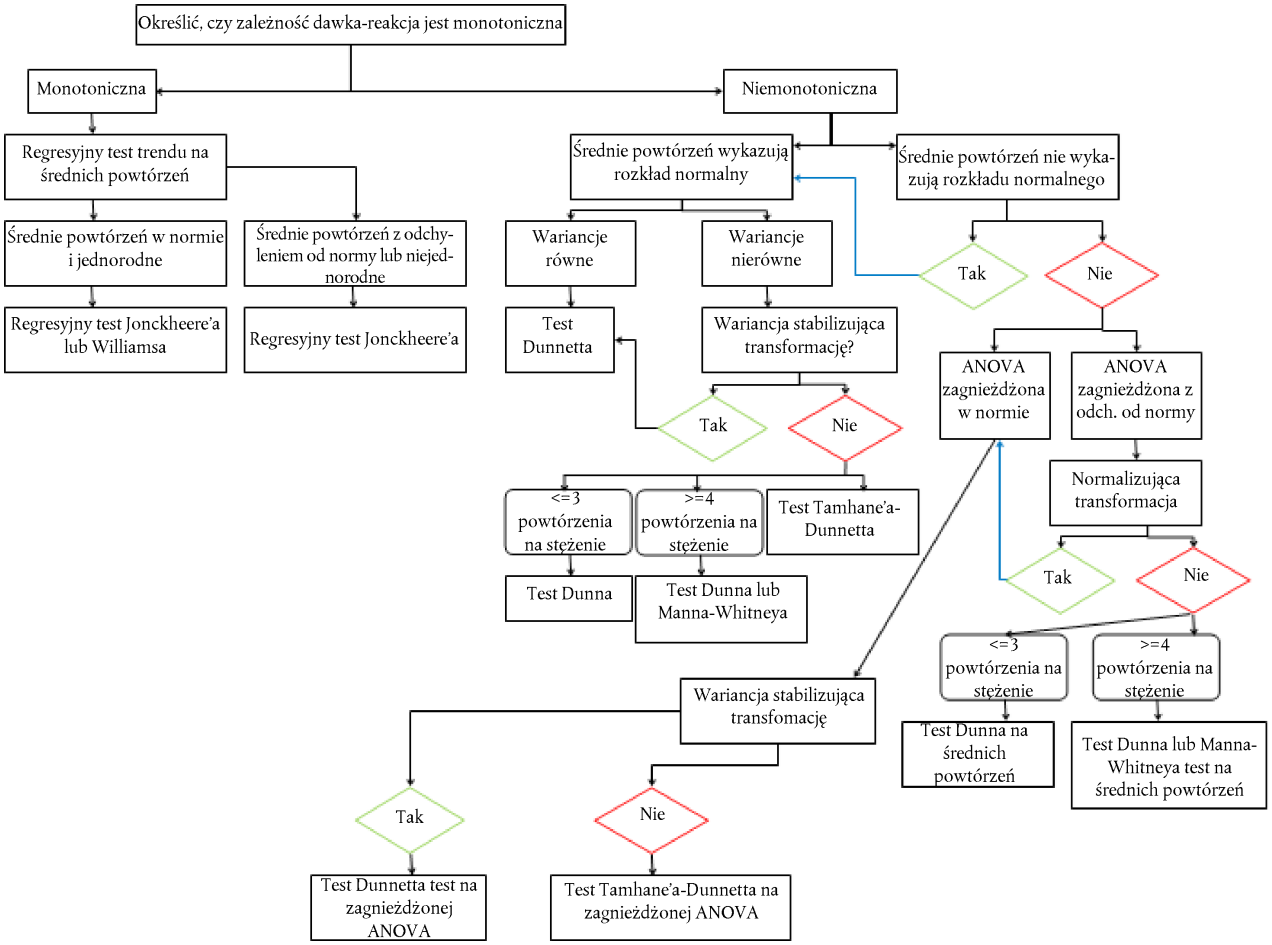
Próbka wzmocniona zostanie przygotowana przez dodanie znanej ilości międzylaboratoryjnego wzorca do próbki osocza pobranego od samca z próby kontrolnej. Próbka zostanie wzmocniona w celu otrzymania stężenia witellogeniny będącego 10–100-krotnością oczekiwanego stężenia witellogeniny u samców ryb z próby kontrolnej. Próbka osocza pobranego od samca z próby kontrolnej, która zostanie wzmocniona, może pochodzić od pojedynczej ryby albo może składać się z próbek pobranych od kilku ryb.

Podpróbka niewzmocnionego osocza samców z próby kontrolnej zostanie poddana analizie w co najmniej dwóch zduplikowanych studzienkach. Próbka wzmocniona również zostanie poddana analizie w co najmniej dwóch zduplikowanych studzienkach. Średnia ilość witellogeniny w obu niewzmocnionych próbkach osocza pobranych od samców z próby kontrolnej zostanie dodana do obliczonej ilości witellogeniny dodanej do próbek w celu ich wzmocnienia, aby oznaczyć przewidywane stężenie. Stosunek oczekiwanego stężenia do zmierzonego stężenia zostanie odnotowany wraz z wynikami każdego zestawu badań przeprowadzonych w danym dniu.

▼M6

Dodatek 8

Schemat decyzyjny do celów analizy statystycznej



▼M6

C.38. BADANIE PRZEOBRAŻENIA PŁAZÓW

WPROWADZENIE

1. Opisywana metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 231 (2009 r.) w sprawie badań. Konieczność opracowania i zweryfikowania badania umożliwiającego wykrycie substancji chemicznych oddziałujących na tarczycę kręgowców wynika z obawy, że środowiskowe poziomy substancji chemicznych mogą wywoływać działania niepożądane zarówno u ludzi, jak i w przypadku dzikiej fauny i flory. W 1998 r. OECD zapoczątkowała działania mające na celu przegląd istniejących wytycznych w sprawie badań i opracowanie nowych wytycznych dotyczących przeglądu i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego, nadając tym działaniom wysoki priorytet. Jednym z elementów tych działań było opracowanie wytycznej w sprawie badań dotyczącej przeglądu substancji chemicznych oddziałujących na gruczoł tarczowy kręgowców. Zaproponowano zarówno ulepszenie 28-dniowego badania toksyczności doustnej wywołanej powtarzanym dawkowaniem u gryzoni (rozdział B.7 niniejszego załącznika), jak i badanie przeobrażenia płazów. Ulepszoną metodę badawczą B.7 poddano weryfikacji, a następnie wydano zweryfikowaną metodę badania. Badanie przeobrażenia płazów poddano zakrojonemu na szeroką skalę programowi weryfikacji, który obejmował badania wewnątrzlaboratoryjne i międzylaboratoryjne wykazujące istotność i wiarygodność badania (1, 2). Następnie weryfikacja badania stała się przedmiotem wzajemnej oceny przez zespół niezależnych ekspertów (3). Niniejsza metoda badawcza jest efektem doświadczeń zdobytych podczas badań weryfikacyjnych związanych z wykrywaniem substancji chemicznych oddziałujących na tarczycę i prac prowadzonych w innych państwach będących członkami OECD.

ZASADA BADANIA

2. Badanie przeobrażenia płazów jest badaniem przesiewowym mającym na celu empiryczną identyfikację substancji chemicznych, które mogą zaburzać prawidłowe funkcjonowanie osi podwzgórze–przysadka–tarczyca. Badanie przeobrażenia płazów odpowiada ogólnemu modelowi kręgowców w zakresie, w jakim oparte jest ono na zachowanych strukturach i funkcjach osi podwzgórze–przysadka–tarczyca. Jest to ważne badanie, ponieważ przeobrażenie płazów stanowi dobrze zbadany, zależny od tarczycy proces, będący odpowiedzią na substancje chemiczne aktywne w obrębie osi podwzgórze–przysadka–tarczyca i jest jedynym istniejącym badaniem umożliwiającym wykrycie aktywności tarczycy u zwierzęcia w fazie rozwoju morfologicznego.

3. Zasadniczo plan doświadczalny obejmuje poddanie kijanek *Xenopus laevis* w 51. stadium działaniu co najmniej trzech prób z różnymi stężeniami badanej substancji chemicznej i próbie kontrolnej z wodą rozcieńczającą przez 21 dni. Istnieją cztery powtórzenia każdego zabiegu. W momencie rozpoczęcia badania zagęszczenie kijanek w stadium larwalnym wynosi 20 sztuk na zbiornik badawczy w odniesieniu do wszystkich grup poddawanych zabiegom. Punkty końcowe obserwacji obejmują: długość kończyn tylnych, długość mierzona od otworu gębowego do odbytu, stadium rozwojowe, mokra masa, histologia tarczycy i dzienne obserwacje śmiertelności.

OPIS METODY

Badany gatunek

4. Gatunek *Xenopus laevis* hoduje się rutynowo w laboratoriach na całym świecie i jest on łatwo dostępny za pośrednictwem dostawców komercyjnych. Ten gatunek można łatwo skłonić do rozmnażania przez cały rok, stosując zastrzyki z ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG), a uzyskane w ten sposób larwy można hodować w dużej liczbie aż do osiągnięcia wybranego stadium rozwoju, aby umożliwić wykorzystanie protokołów badań dotyczących konkretnego stadium. Zaleca się, aby larwy

▼M6

użyte do badania pochodziły od własnych dorosłych osobników. Inną możliwość, chociaż nie jest to preferowana procedura, stanowi przewiezienie komórek jajowych lub zarodków do laboratorium przeprowadzającego badanie i następnie poddanie ich aklimatyzacji; wysyłanie stadiów larwalnych do wykorzystania w badaniu jest niedopuszczalne.

Sprzęt i materiały

5. W celu wykonania niniejszego badania wymagane jest zastosowanie następującego sprzętu i materiałów:

a) układu narażenia (zob. opis poniżej);

b) akwariów wykonanych ze szkła lub stali nierdzewnej (zob. opis poniżej);

c) zbiorników reprodukcyjnych;

d) aparatury do regulacji temperatury (np. urządzeń do ogrzewania lub chłodzenia (ustawionych na temperaturę 22 ± 1 °C));

e) termometru;

f) dwuokularowego mikroskopu preparacyjnego;

g) aparat cyfrowego o rozdzielczości co najmniej 4 megapikseli i z funkcją mikro;

h) oprogramowania do cyfrowej obróbki obrazu;

i) płytek Petriego (np. 100 × 15 mm) lub przeźroczystej komory porównywalnej wielkości z tworzywa sztucznego;

j) wagi analitycznej umożliwiającej pomiar z dokładnością do trzeciego miejsca po przecinku (mg);

k) miernika rozpuszczonego tlenu;

l) pehametru;

m) miernika natężenia światła umożliwiającego pomiar w luksach;

n) różnych laboratoryjnych naczyń szklanych i narzędzi;

o) regulowanych pipet (10–5 000 µl) lub różnych pipet o równoważnych pojemnościach;

p) badanej substancji chemicznej w ilościach wystarczających do wykonania badania, najlepiej z jednej partii;

q) instrumentów analitycznych odpowiednich dla badanej substancji chemicznej lub zakontraktowanych usług analitycznych.

Testowalność chemiczna

6. Badanie przeobrażenia płazów jest oparte na protokole narażenia w środowisku wodnym, zgodnie z którym badana substancja chemiczna jest wprowadzana do komór badawczych za pośrednictwem układu przepływowego. Metody przepływowe mają jednak ograniczenia dotyczące rodzaju substancji chemicznej, która może być badana, wynikające z jej właściwości fizykochemicznych. W związku z tym przed zastosowaniem tego protokołu należy uzyskać podstawowe informacje na temat danej substancji chemicznej, istotne dla określania jej testowalności, oraz należy sprawdzić informacje podane w wytycznej OECD dotyczącej badania toksyczności wodnej trudnych substancji i mieszanin (*Guidance Document*

▼M6

on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) (4). Właściwości wskazujące, że badanie danej substancji chemicznej w środowisku wodnym może być utrudnione: wysoki współczynnik podziału oktanol/woda (log K_{ow}), duża lotność, podatność na hydrolizę i podatność na fotolizę w warunkach oświetlenia, które występują w laboratorium. Inne czynniki również mogą mieć znaczenie przy określaniu testowalności i należy je ustalić indywidualnie dla każdego przypadku. Jeżeli w przypadku danej substancji chemicznej nie można przeprowadzić badania z wykorzystaniem przepływowego układu badawczego, można wykorzystać układ wymiany statycznej. Jeżeli żaden z układów nie nadaje się do wprowadzania badanej substancji chemicznej, wówczas standardowo nie bada się jej na podstawie tego protokołu.

Układ narażenia

7. W miarę możliwości preferowany jest układ przepływowy z wykorzystaniem rozcieńczalnika zamiast układu wymiany statycznej. Jeżeli właściwości fizyczne lub chemiczne którejkolwiek z badanych substancji chemicznych nie pozwalają wprowadzić jej do układu przepływowego z rozcieńczalnikiem, wówczas można zastosować alternatywny układ narażenia (np. wymianę statyczną). Części składowe układu, które mają kontakt z wodą, powinny być wykonane ze szkła, stali nierdzewnej lub politetrafluoroetylenu. Można jednak zastosować odpowiednie tworzywa sztuczne, o ile nie wpływa to na protokół badania. Jako zbiorniki do badań narażenia należy stosować akwaria wykonane ze szkła lub stali nierdzewnej i wyposażone w syfony, o objętości od około 4,0 do 10,0 l i minimalnej głębokości wody 10–15 cm. Układ powinien umożliwiać utrzymanie wszystkich stężeń ekspozycyjnych i próby kontrolnej z czterema kontrpróbami na każdy zabieg. Natężenie przepływu do każdego zbiornika powinno być stałe zarówno względu na utrzymanie warunków biologicznych, jak i narażenia chemicznego (np. 25 ml/min.). Zbiorniki do zabiegów narażenia należy losowo umieścić w układzie narażenia w celu ograniczenia ewentualnych skutków wynikających z ich umiejscowienia, między innymi niewielkich różnic temperatury, natężenia światła itd. Należy zastosować światło fluorescencyjne, aby zapewnić fotoperiod wynoszący 12 godzin światła i 12 godzin ciemności, o natężeniu wynoszącym 600–2 000 luksów (lumenów/m^2) na powierzchni wody. W każdym zbiorniku testowym temperatura wody powinna być utrzymana na poziomie 22 ± 1 °C, pH utrzymane w przedziale 6,5–8,5, a stężenie rozpuszczonego tlenu > 3,5 mg/l (> 40 % nasycenia powietrzem). Minimalną temperaturę wody, pH i rozpuszczony tlen należy mierzyć raz w tygodniu, jednak w co najmniej jednym naczyniu badawczym temperaturę należy monitorować w sposób ciągły. W dodatku 1 przedstawione zostały warunki doświadczalne, w jakich należy stosować protokół. W celu uzyskania dalszych informacji dotyczących skompilowania przepływowych układów ekspozycji lub układów wymiany statycznej należy zapoznać się z opracowanymi przez ASTM wytycznymi dotyczącymi przeprowadzania badań toksyczności ostrej na materiale badawczym przy użyciu ryb, dużych bezkręgowców i płazów (*Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians*) (5) oraz ogólnymi badaniami toksyczności w środowisku wodnym.

Jakość wody

8. Można użyć każdej wody, która jest dostępna w danym miejscu (np. woda źródlana lub woda wodociągowa przefiltrowana przez filtr węglowy) i która umożliwia normalny wzrost i rozwój kijanek *X. laevis*. Ponieważ jakość lokalnie dostępnej wody może znacząco różnić się w zależności od obszaru, należy wykonać analizy jakości wody, w szczególności jeżeli nie są dostępne historyczne dane dotyczące przydatności wody do hodowli *Xenopus*. Szczególną uwagę należy zwrócić na to, aby woda nie zawierała miedzi, chloru i chloramin, ponieważ wszystkie te substancje są toksyczne dla żab i kijanek. Zaleca się również zbadanie wody pod kątem poziomów tła fluorku, nadchloranu i chloranu (produktów ubocznych dezynfekcji wody pitnej), ponieważ wszystkie te aniony są substratami dla transportera

▼M6

jodu tarczycy i podwyższony poziom któregokolwiek z nich może zakłócić wynik badania. Analiza powinna zostać wykonana przed rozpoczęciem badania, a woda użyta do badania powinna zazwyczaj być pozbawiona tych anionów.

Stężenie jodku w badanej wodzie

9. Aby tarczyca mogła syntezować hormony tarczycy, larwy muszą mieć dostęp do wystarczającej ilości związków jodu dostarczonych za pośrednictwem wody lub pożywienia. Obecnie nie istnieją żadne określone empirycznie wytyczne dotyczące minimalnego stężenia jodu. Obecność jodu może jednak wpływać na zdolność reagowania tarczycy na substancje aktywne oddziałujące na gruczoł tarczowy i wiadomo, że jod moduluje podstawową aktywność tarczycy – aspekt, który należy uwzględnić, interpretując wyniki histopatologii tarczycy. W sprawozdaniu należy podać stężenia jodu w wodzie do badania. Na podstawie dostępnych danych z badania weryfikacyjnego wykazano, że protokół funkcjonuje odpowiednio, jeżeli stężenia jodu (I^-) w wodzie do badania mieszczą się w przedziale 0,5–10 µg/l. Najlepiej byłoby, gdyby minimalne stężenie jodu w wodzie do badania wynosiło 0,5 µg/l. Jeżeli do badania stosowana jest woda regenerowana odtworzona z wody dejonizowanej, należy dodać jod w minimalnym stężeniu wynoszącym 0,5 µg/l. W sprawozdaniu należy uwzględnić każde dodatkowe uzupełnienie wody do badania jodem lub innymi solami.

Trzymanie zwierząt

Opieka na osobnikami dorosłymi i hodowla

10. Opieka nad osobnikami dorosłymi i hodowla przebiegają zgodnie ze standardowymi wytycznymi, a w celu uzyskania bardziej szczegółowych informacji należy zapoznać się ze standardowymi wytycznymi dotyczących badania teratogenezy w zarodkach żab (*Frog Embryo Teratogenesis Assay (FETAX)*) (6). Takie standardowe wytyczne zawierają przykład odpowiednich metod opieki i hodowli, ale ich ścisłe ich przestrzeganie nie jest konieczne. W celu nakłonienia zwierząt do rozmnażania się parom (3–5) dorosłych samic i samców wstrzykuje się ludzką gonadotropinę kosmówkową (hCG). Żeńskim i męskim osobnikom wstrzykuje się, odpowiednio, 800–1 000 IU i 600–800 IU hCG rozpuszczonego w 0,6–0,9 % roztworze soli fizjologicznej. Pary hodowlane trzymane są w dużych zbiornikach zapewniających spokój i niezmienne warunki dla przyjęcia pozycji ampleksusu. Dno każdego akwarium reprodukcyjnego powinno posiadać fałszywe dno wykonane z nierdzewnej stali lub siatki z tworzywa sztucznego, które umożliwia opadanie pakietów jaj na dno zbiornika. Żaby, które otrzymały zastrzyk późnym popołudniem, zazwyczaj złożą większość skrzeku późnym rankiem następnego dnia. Po złożeniu i zapłodnieniu wystarczającej liczby komórek jajowych dorosłe osobniki powinny zostać usunięte z akwariów reprodukcyjnych.

Opieka nad larwami i selekcja

11. Po usunięciu dorosłych osobników z akwarium reprodukcyjnego komórki jajowe zbiera się i ocenia pod kątem ich żywotności, wykorzystując w tym celu reprezentatywną próbkę zarodków ze wszystkich akwariów reprodukcyjnych. Należy zachować najlepszy skrzek (zaleca się 2–3 pakiety w celu oceny jakości skrzeku) na podstawie żywotności zarodków i ich odpowiedniej liczby (minimum 1 500). Wszystkie organizmy wykorzystane w badaniu powinny pochodzić z jednego okresu godowego (tj. nie należy mieszać skrzeków z różnych okresów). Zarodki należy umieścić na dużej, płaskiej szalce lub płytce i za pomocą pipety lub zakraplacza usunąć wszystkie jaja, które są ewidentnie martwe lub wykazują nieprawidłowości

▼M6

(zob. definicja w (5)). Zdrowe zarodki z każdego z trzech pakietów skrzeku przenosi się do trzech oddzielnych zbiorników wylęgowych. Po czterech dniach od umieszczenia jaj w zbiornikach wylęgowych wybiera się najlepszy skrzek pod względem żywotności i skutecznego wylęgu i przenosi się larwy do odpowiedniej liczby zbiorników hodowlanych o temperaturze 22 ± 1 °C. Ponadto pewną liczbę dodatkowych larw przenosi się do dodatkowych zbiorników w celu zastąpienia larw w razie wystąpienia upadków w zbiornikach hodowlanych w pierwszym tygodniu. Procedura ta pozwala zachować stałe zagęszczenie organizmów i przez to ograniczyć rozbieżności rozwojowe w kohorcie pochodzącej z jednego skrzeku. Wszystkie zbiorniki hodowlane należy codziennie opróżniać do czysta przez syfon. Jako środek ostrożności zaleca się stosowanie rękawic winylowych lub nitrylowych zamiast rękawic lateksowych. Padnięte zwierzęta należy usuwać codziennie i dodawać larwy zastępcze w celu utrzymania zagęszczenia organizmów podczas pierwszego tygodnia. Karmienie powinno mieć miejsce co najmniej dwa razy dziennie.

12. Na etapie poprzedzającym narażenie kijanki są aklimatyzowane do warunków właściwego etapu narażenia, w tym do rodzaju pokarmu, temperatury, cyklu światła/ciemności i pożywki hodowlanej. W związku z tym zaleca się, aby na etapie poprzedzającym narażenie i etapie narażenia była wykorzystywana ta sama woda do hodowli/woda rozcieńczająca. Jeżeli stosowany jest statyczny system hodowli kijanek na etapie poprzedzającym narażenie, pożywkę hodowlaną należy całkowicie wymieniać co najmniej dwa razy w tygodniu. Należy unikać zatłoczenia spowodowanego nadmierną liczebnością larw w trakcie etapu poprzedzającego narażenie, ponieważ może to znacznie wpłynąć na rozwój kijanek na kolejnych etapach badania. W związku z tym zagęszczenie hodowli nie powinno przekraczać w przybliżeniu czterech kijanek na jedną pożywkę hodowlaną (układ statycznego narażenia) lub 10 kijanek na jedną pożywkę hodowlaną (np. przy natężeniu przepływu wynoszącym 50 ml/min. w układzie poprzedzającym narażenie lub układzie hodowlanym). W takich warunkach kijanki powinny w ciągu dwunastu dni rozwinąć się ze stadium 45/46 do stadium 51. Kijanki reprezentatywne dla tej populacji wyjściowej należy codziennie kontrolować pod względem stadium rozwojowego w celu oszacowania odpowiedniego momentu do rozpoczęcia narażenia. Należy dbać, aby ograniczyć do minimum stres i traumę, na jakie narażone są kijanki, w szczególności podczas poruszania, czyszczenia akwariów i przenoszenia larw. Należy unikać stresujących warunków/działań, takich jak głośny lub nieustanny hałas, stukanie palcem w akwarium, drgania w akwariach, nadmierna aktywność w laboratorium i nagłe zmiany warunków środowiskowych (dostępności światła, temperatury, pH, stężenie rozpuszczonego tlenu, wartości natężenia przepływów itd.). Jeżeli kijanki nie osiągną 51. stadium w ciągu 17 dni po zapłodnieniu, za potencjalną przyczynę należy uznać nadmierny stres.

Hodowla i karmienie larw

13. Kijanki karmi się dostępnym w handlu pokarmem dla kijanek wykorzystywanym podczas badania weryfikacyjnego (zob. również dodatek 1) w okresie poprzedzającym narażenie (za Nieuwkoopem i Faberem (NF) 45/46. stadium (8)) i w takcie całego okresu trwania badania wynoszącego 21 dni lub stosuje się inna dietę, która wykazywała takie samo działanie w badaniu przeobrażenia płazów. Schemat żywienia w okresie poprzedzającym narażenie należy dokładnie dostosować do potrzeb rozwijających się kijanek. Oznacza to, że nowo wyklutym kijankom należy dostarczać małe porcje pokarmu kilka razy dziennie (co najmniej dwa). Należy unikać podawania nadmiaru pokarmu, aby i) zachować jakość wody oraz ii) aby zapobiec zatkaniu filtrów skrzelowych cząsteczkami pokarmu i drobnej materii organicznej. W przypadku pokarmu dla kijanek stosowanego w badaniach weryfikacyjnych dzienne dawki pokarmu należy zwiększać w miarę wzrostu kijanki do około 30 mg na zwierzę na dobę tuż przed rozpoczęciem badania. Badania weryfikacyjne wykazały, że dostępny w handlu pokarm wspomaga właściwy wzrost i rozwój kijanek gatunku

▼M6

X. laevis, a dzięki dużemu rozdrobnieniu jego cząstki pozostają zawieszone w wodzie na długi okres i są wypłukiwane przez przepływającą wodę. W związku z tym całkowitą dzienną ilość pokarmu należy podzielić na mniejsze porcje i podawać co najmniej dwa razy dziennie. W przypadku takiego pokarmu schemat żywienia został przestawiony w tabeli 1. Należy rejestrować porcje pokarmu. Pokarm może być podawany na sucho lub jako roztwór podstawowy przygotowany w wodzie rozcieńczającej. Roztwór podstawowy tego rodzaju należy sporządzać na nowo co drugi dzień i przechowywać w temperaturze do 4 °C, gdy nie jest używany.

Tabela 1.

Schemat żywienia dostępnym w handlu pokarmem dla kijanek zastosowany podczas badań weryfikacyjnych w odniesieniu do kijanek *X. laevis* w trakcie rozwojowej części badania przeobrażenia płazów w warunkach przepływu

Dzień badania	Dawka pokarmu (mg pokarmu/zwierzę/dobę)
0-4.	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Chemia analityczna

14. Przed przystąpieniem do badania należy ocenić stabilność badanej substancji chemicznej, wykorzystując w tym celu istniejące informacje dotyczące jej rozpuszczalności, podatności na rozkład i lotności. Z każdego zbiornika z kontrpróbą należy pobrać do analiz chemicznych co najmniej cztery próbki roztworów do badań w każdym stężeniu w momencie rozpoczęcia badania (dzień 0) i co tydzień w trakcie trwania badania. Zaleca się również analizę każdego badanego stężenia podczas przygotowywania układu przed rozpoczęciem badania w celu zweryfikowania efektywności układu. Ponadto zaleca się analizę roztworów podstawowych podczas ich wymiany, w szczególności jeżeli objętość roztworu podstawowego nie zapewnia odpowiednich ilości substancji chemicznej na cały czas trwania okresów rutynowego pobierania próbek. W przypadku substancji chemicznych, których nie można wykryć na pewnym poziomie stężenia lub na poziomie wszystkich stężeń wykorzystanych w badaniu, należy dokonać pomiaru roztworów podstawowych i odnotować natężenie przepływu w układzie w celu obliczenia stężeń nominalnych.

Dostarczanie substancji chemicznej

15. Metoda wprowadzania badanej substancji chemicznej do układu może różnić się w zależności od właściwości fizykochemicznych substancji. Substancje chemiczne rozpuszczalne w wodzie można rozpuszczać w podwielokrotnych częściach wody do badania w stężeniu, które pozwoli na wprowadzenie tych substancji w docelowym stężeniu badanym do układu przepływowego. Substancje chemiczne, które są płynne w temperaturze pokojowej i słabo rozpuszczalne w wodzie, można wprowadzać, wykorzystując do tego celu metody saturatora ciecz-ciecz. Substancje chemiczne stałe w temperaturze pokojowej i słabo rozpuszczalne w wodzie mogą zostać wprowadzone za pomocą saturatorów z kolumną wypełnioną watą szklaną (7). Zaleca się zastosowanie układu badawczego bez nośnika, jednak różne badane substancje chemiczne będą posiadały różne właściwości fizykochemiczne, które będą prawdopodobnie wymagały różnego podejścia do przygotowania wody służącej do narażenia na działanie substancji chemicznej. Zaleca się unikać stosowania rozpuszczalników

▼M6

lub nośników, ponieważ: i) niektóre rozpuszczalniki same mogą powodować toksyczność lub niepożądane albo nieoczekiwane reakcje endokrynologiczne, ii) badanie substancji chemicznych, których rozpuszczalność w wodzie zostaje przekroczona (co często ma miejsce w wyniku stosowania rozpuszczalników), może skutkować niedokładnym określeniem efektywnych stężeń oraz iii) stosowanie rozpuszczalników w przypadku badań długoterminowych może skutkować znacznym rozrostem biofilmu związanym z aktywnością mikroorganizmów. W przypadku substancji chemicznych, których badanie nastręcza trudności, rozpuszczalnik można zastosować tylko w ostateczności, a w celu wyboru najlepszej metody należy zapoznać się z wytyczną OECD dotyczącą badania toksyczności wodnej trudnych substancji i mieszanin (*Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*) (4). Wybór rozpuszczalnika będzie uwarunkowany chemicznymi właściwościami substancji chemicznej. Do rozpuszczalników, które okazały się skuteczne w przypadku badań toksyczności w środowisku wodnym, zalicza się aceton, etanol, metanol, dimetyloformamid i glikol trójetylenowy. W przypadku wykorzystania rozpuszczalnika jako nośnika stężenie rozpuszczalnika powinno być niższe niż chroniczne stężenie NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian); w wytycznej OECD zaleca się maksymalne stężenie 100 µl/l, a zgodnie z ostatnim przeglądem zaleca się stosowanie stężenia rozpuszczalnika wynoszącego zaledwie 20 µl/l wody rozcieńczającej (12). Jeżeli zastosowane zostaną nośniki rozpuszczalnikowe, oprócz prób kontrolnych bez rozpuszczalnika (czysta woda) należy również ocenić odpowiednie próby kontrolne z rozpuszczalnikiem. Jeżeli nie możliwe jest podanie substancji chemicznej z wodą ze względu na jej właściwości fizykochemiczne (niska rozpuszczalność) albo ograniczoną dostępność chemiczną, można rozważyć jej wprowadzanie z pokarmem. Przeprowadzono wstępne prace nad narażeniem z pokarmem, jednak ta droga narażenia nie jest powszechnie stosowana. Wybór metody należy udokumentować i zweryfikować w sposób analityczny.

Dobór badanych stężeń

Ustalenie wysokiego stężenia badanego

16. Do celów niniejszego badania wysokie stężenie badane odpowiada granicy rozpuszczalności badanej substancji chemicznej; maksymalnemu tolerowanemu stężeniem (MTC) w przypadku substancji chemicznych o dużej toksyczności; albo 100 mg/l, w zależności od tego, która z tych wartości jest najniższa.

17. MTC jest definiowane jako najwyższe badane stężenie substancji chemicznej, którego skutkiem jest mniej niż 10 % przypadków śmiertelności ostrej. Przy zastosowaniu tego podejścia zakłada się istnienie empirycznych danych dotyczących śmiertelności ostrej, na podstawie których oszacować można MTC. Oszacowanie MTC może być niedokładne i zazwyczaj wymaga odwołania się do swojej najlepszej wiedzy. Chociaż wykorzystanie modeli regresji jest najodpowiedniejszym pod względem technicznym podejściem do oszacowania MTC, przydatne przybliżenie MTC można uzyskać na podstawie istniejących danych dotyczących przypadków śmiertelności ostrej dzięki zastosowaniu 1/3 wartości LC_{50}. Dane dotyczące toksyczności ostrej dla badanych gatunków mogą jednak być niedostępne. Jeżeli niedostępne są dane dotyczące toksyczności ostrej charakterystyczne dla danego gatunku, można wówczas przeprowadzić 96-godzinne badanie LC_{50} na kijankach reprezentatywnych (tj. w tym samym stadium) dla kijanek uczestniczących w badaniu przeobrażenia płazów. Jeżeli dostępne są dane dotyczące innych gatunków wodnych (np. badania LC_{50} dla ryb lub innych gatunków płazów), można odwołać się do swojej najlepszej wiedzy w celu oszacowania prawdopodobnego MTC na podstawie międzygatunkowej ekstrapolacji.

18. W przypadkach, gdy substancja chemiczna nie charakteryzuje się toksycznością ostrą i jej rozpuszczalność wynosi powyżej 100 mg/l, za najwyższe badane stężenie należy uznać 100 mg/l, ponieważ takie stężenie uznaje się zazwyczaj za „praktycznie nietoksyczne”.

▼M6

19. W przypadku gdy metody przepływowe nie pozwalają uzyskać MTC, można zastosować metody wymiany statycznej, chociaż nie jest to zalecana procedura. Jeżeli zastosowane zostały metody wymiany statycznej, wówczas należy udokumentować stabilność stężenia badanej substancji chemicznej, które nie powinna przekraczać limitów kryteriów efektywności. Zaleca się, aby okresy wymiany wynosiły dwadzieścia cztery godziny. Okresy wymiany nie mogą przekraczać 72 godzin. Ponadto parametry jakości wody (np. DO, temperatura, pH itd.) należy mierzyć pod koniec każdego okresu wymiany bezpośrednio przed wymianą.

Zakres badanych stężeń

20. Wymagane jest zastosowanie *minimum* trzech badanych stężeń i próby z czystą wodą (oraz, jeżeli jest to konieczne, grupy kontrolnej nośnika). Minimalna różnica badanych stężeń pomiędzy najwyższym a najniższym stężeniem powinna wynosić mniej więcej jeden rząd wielkości. Maksymalna wartość między dawkami wynosi 0,1, a minimalna – 0,33.

PROCEDURA:

Rozpoczęcie i przeprowadzenie badania

Dzień 0

21. Narażanie należy rozpocząć w momencie, gdy wystarczająca liczba kijanek podstawowej populacji przed narażeniem osiągnęła 51. stadium rozwojowe zgodnie z kryteriami Nieuwkoopa i Fabera (8), co oznacza wiek nie przekraczający 17 po zapłodnieniu. W celu wyboru zwierząt, które zostaną użyte do badania, zdrowe i normalnie wyglądające kijanki z podstawowej populacji należy umieścić razem w pojedynczym naczyniu zawierającym odpowiednią ilość wody rozcieńczającej. Aby określić stadium rozwoju, kijanki należy pojedynczo wyjmować ze wspólnego zbiornika za pomocą małej siatki lub sitka i przenosić do przezroczystej komory pomiarowej (np. na płytkę Petriego o wymiarach 100 mm) zawierającej wodę rozcieńczającą. W celu określenia stadium rozwoju zaleca się, aby nie stosować znieczulenia, chociaż przed przeniesieniem można znieczulić poszczególne kijanki stosując 100 mg/l metanosulfonioanu trikainy (np. MS-222) odpowiednio zbuforowanego wodorowęglanem sodu (pH 7,0). W przypadku zastosowania tego sposobu metodę dotyczącą odpowiedniego użycia np. MS-222 do znieczulenia należy otrzymać od doświadczonych laboratoriów i podać wraz z wynikami badań. Należy ostrożnie obchodzić się ze zwierzętami podczas przenoszenia, aby zminimalizować wynikający z tego stres i nie dopuścić do zranienia.

22. Stadium rozwojowe zwierząt określa się, stosując dwuokularowy mikroskop preparacyjny. W celu zminimalizowania zasadniczej zmienności w odniesieniu do stadium rozwojowego ważne jest, aby etap ten został przeprowadzony w jak najdokładniejszy sposób. Według Nieuwkoopa i Fabera (8) pierwotnym wyznacznikiem rozwoju decydującym o określeniu 51. stadium rozwojowego organizmów jest morfologia kończyny tylnej. Morfologiczne właściwości kończyn tylnych należy zbadać pod mikroskopem. Chociaż w celu uzyskania wyczerpujących informacji dotyczących oceny stadium kijanek należy zapoznać się z całym przewodnikiem Nieuwkoopa i Fabera (8), stadium można w wiarygodny sposób ocenić, wykorzystując wyraźnie widoczne morfologiczne cechy charakterystyczne. Poniższa tabela może zostać wykorzystana do uproszczenia i standaryzacji procesu oceny stadium dzięki określeniu tych wyraźnie widocznych morfologicznych cech charakterystycznych związanych z różnymi stadiami, przy założeniu, że rozwój przebiega prawidłowo.

▼M6

Tabela 2.

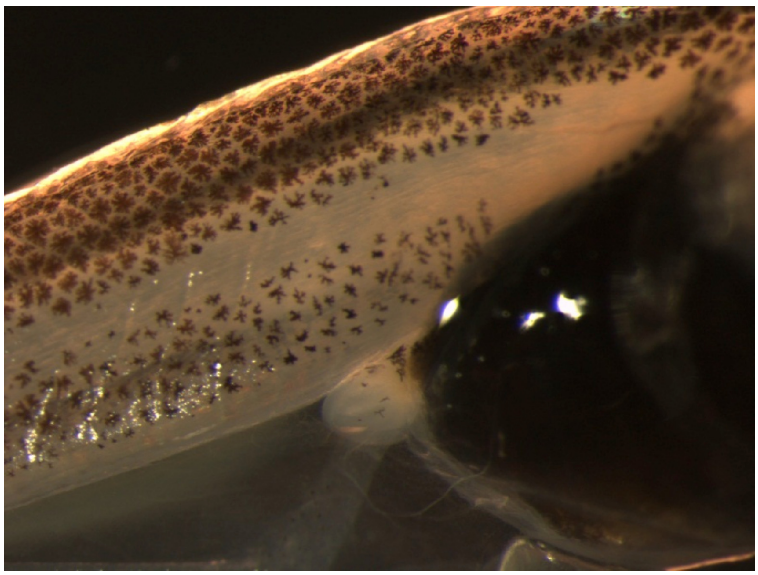
Wyraźnie widoczne morfologiczne cechy charakterystyczne wyznaczające stadium rozwoju na podstawie wskazówek Nieuwkoopa i Fabera.

Wyraźnie widoczne morfologiczne cechy charakterystyczne	Stadium rozwojowe															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Kończyna tylna	X	X	X	X	X	X	X									
Kończyna przednia						X	X	X	X	X						
Struktura twarzoczaszki										X	X	X	X			
Morfologia nerwu węchowego											X	X	X			
Długość ogona													X	X	X	X

23. W momencie rozpoczęcia badania wszystkie kijanki powinny znajdować się 51. stadium rozwoju. Najbardziej widoczną morfologicznie cechą charakterystyczną określającą stadium jest w przypadku tego stadium morfologia kończyny tylnej, która została pokazana na rys. 1.

Rysunek 1.

Morfologia kończyny tylnej kijanki *X. laevis* w 51. stadium.



24. Oprócz wyboru na podstawie stadium rozwojowego zastosować można opcjonalnie wybór na podstawie wielkości zwierząt użytych do badania. W tym celu w dniu 0 należy zmierzyć długość całego ciała (nie długość mierzoną od otworu gębowego do odbytu) dla podpróby około 20 kijanek w 51. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. Po obliczeniu średniej długości całego ciała dla tej grupy zwierząt można określić minimalną i maksymalną graniczną wartość długości całego ciała zwierząt użytych do badania, dopuszczając średnią wartość ± 3 mm (średnie wartości długości całego ciała dla kijanek w 51. stadium mieszczą się w przedziale między 24,0 i 28,1 mm). Stadium rozwojowe stanowi jednak zasadniczy parametr przy określaniu gotowości każdego z badanych zwierząt. Z badania wykluczyć należy kijanki z wyraźnie widocznymi wadami rozwojowymi lub urazami.

▼M6

25. Kijanki spełniające opisane powyżej kryteria stadium rozwojowego przechowywane są w zbiorniku hodowlanym z czystą wodą do czasu ukończenia procesu oceny stadium. Po zakończeniu oceny stadium larwy losowo rozmieszcza się w zbiornikach zabiegowych, tak aby w każdym zbiorniku znalazło się 20 larw. Każdy ze zbiorników zabiegowych sprawdza się następnie pod kątem zwierząt o nietypowym wyglądzie (np. urazy, nietypowe zachowanie podczas pływania itd.). Kijanki mające wyraźnie niezdrowy wygląd należy usunąć ze zbiorników zabiegowych i zastąpić nowo wybranymi larwami ze wspólnego zbiornika.

Uwagi

26. W celu uzyskania bardziej szczegółowych informacji dotyczących procedur zakończenia badania i postępowania z kijankami należy zapoznać się z wytyczną OECD dotyczącą histologii tarczycy płazów (*Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology*) (9).

Dzień 7 Pomiary

27. W 7. dniu z każdego zbiornika badawczego usuwa się pięć losowo wybranych kijanek na każdą kontrpróbę. Wykorzystanie losowej procedury powinno zapewnić każdemu organizmowi użytemu do badania takie samo prawdopodobieństwo zostania wybranym. Można to osiągnąć, wykorzystując dowolną metodę randomizacji, ale konieczne jest złapanie każdej kijanki. Niewybrane kijanki wracają do zbiornika, z którego pochodzą, a wybrane kijanki zostają w humanitarny sposób uśmiercone za pomocą 150–200 mg/l np. MS-222 odpowiednio zbuforowanego wodorowęglanem sodu do uzyskania pH 7,0. Uśmiercone kijanki opłukuje się w wodzie i osusza na bibule, a następnie określa się ich masę ciała z dokładnością do pełnego miligrama. W odniesieniu do każdej kijanki określa się długość kończyn tylnych, długość mierzoną od otworu gębowego do odbytu i stadium rozwojowe (wykorzystując dwuokularowy mikroskop preparacyjny).

21. dzień – Pomiary (Zakończenie badania)

28. W dniu zakończenia badania (21. dzień) pozostałe kijanki usuwa się ze zbiorników badawczych i w humanitarny sposób uśmierca, jak powyżej, za pomocą 150–200 mg/l np. MS-222 odpowiednio zbuforowanego wodorowęglanem sodu. Kijanki płucze się w wodzie i osusza na bibule, a następnie określa się ich masę ciała z dokładnością do pełnego miligrama. W odniesieniu do każdej kijanki określa się jej stadium rozwojowe, długość mierzoną od otworu gębowego do odbytu i długość kończyn tylnych.

29. Wszystkie larwy umieszcza się w utrwalaczu Davidsona na 48–72 godzin albo jako próbki w postaci całego ciała albo jako próbki w postaci wyciętego fragmentu tkanki głowy zawierającego dolną szczękę do oceny histologicznej. Do celów histopatologicznych należy pobrać próbki od ogółem pięciu kijanek z każdego zbiornika z kontrpróbą. Ponieważ wysokość komórek folikularnych jest zależna od stadium (10), najodpowiedniejszym podejściem do pobierania próbek do analizy histologicznej jest wykorzystanie, o ile to możliwe, osobników dopasowane pod względem stadium. W celu wyboru osobników dopasowanych pod względem stadium wszystkie larwy muszą najpierw zostać ocenione pod kątem stadium rozwojowego przed wyborem i późniejszym przetwarzaniem na potrzeby gromadzenia danych i utrwalania. Jest to konieczne, ponieważ normalna rozbieżność w rozwoju spowoduje zróżnicowany rozkład stadiów w każdym zbiorniku z kontrpróbą.

30. Zwierzęta wybrane do badań histopatologicznych (n = 5 z każdej kontrpróby) powinny, w miarę możliwości, odpowiadać medianie stadium prób kontrolnych (połączone kontrpróby). W przypadku zbiorników z kontrpróbą, w których znajduje się więcej niż pięć larw w odpowiednim stadium, należy wybrać losowo pięć larw.

▼M6

31. W przypadku zbiorników z kontrpróbą, w których znajduje się mniej niż pięć larw w odpowiednim stadium, należy losowo wybrać osobniki znajdujące się w bezpośrednio niższym lub wyższym stadium rozwoju w celu uzyskania całkowitej wielkości próby wynoszącej pięć larw na kontrpróbę. Decyzję o wybraniu dodatkowych larw z albo bezpośrednio niższego, albo bezpośrednio wyższego stadium rozwoju zaleca się podjąć na podstawie ogólnej oceny rozkładu stadiów w próbie kontrolnej i w grupie poddanej zabiegom chemicznym. Oznacza to, że jeżeli zabieg chemiczny związany jest z opóźnieniem rozwoju, należy wybrać dodatkowe larwy z bezpośrednio niższego stadium rozwoju. Jeżeli z kolei zabieg chemiczny związany jest z przyspieszeniem rozwoju, wtedy należy wybrać dodatkowe larwy z bezpośrednio wyższego stadium.

32. W przypadkach znacznych zmian w rozwoju kijanek spowodowanych zabiegami z badaną substancją chemiczną rozkład stadiów w grupie poddanej działaniu badanej substancji chemicznej może nie pokrywać się z obliczoną medianą stadium rozwojowego w próbie kontrolnej. Tylko w takich przypadkach należy zmodyfikować proces wyboru poprzez wykorzystanie stadium innego niż mediana stadium próby kontrolnej w celu uzyskania próby larw dopasowanych pod względem stadium na potrzeby histopatologii tarczycy. Ponadto jeżeli stadia są nieokreślone (tj. asynchroniczne), do analizy histologicznej należy losowo wybrać 5 kijanek z każdej kontrpróby. Należy podać przesłanki leżące u podstaw wyboru każdej larwy, której stadium nie odpowiada medianie stadium rozwojowego w próbie kontrolnej.

Określenie biologicznych punktów końcowych

33. W takcie trwającego 21 dni etapu narażenia pomiar pierwszorzędowych punktów końcowych wykonuje się w 7. i 21. dniu, konieczna jest jednak codzienna obserwacja zwierząt użytych do badania. Tabela 3 przedstawia przegląd punktów końcowych objętych pomiarami i odpowiadające im punkty czasowe obserwacji. Bardziej szczegółowe informacje dotyczące technicznych procedur pomiaru szczytowych punktów końcowych i ocen histologicznych można znaleźć w wytycznych OCED (9).

Tabela 3.

Punkty czasowe obserwacji dla pierwotnych punktów końcowych w badaniu przeobrażenia płazów

Szczytowe punkty końcowe	Codziennie	Dzień 7	Dzień 21
— Śmiertelność	•		
— Stadium rozwojowe		•	•
— Długość kończyn tylnych		•	•
— Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu		•	•
— Mokra masa ciała		•	•
— Histologia tarczycy			•

▼M6

Szczytowe punkty końcowe

34. Stadium rozwojowe, długość kończyn tylnych, długość mierzona od otworu gębowego do odbytu oraz masa mokra to szczytowe punkty końcowe w badaniu przeobrażenia płazów, z których każdy opisano pokrótce poniżej. Dodatkowe informacje techniczne dotyczące gromadzenia tych danych są dostępne w wytycznych, o których mowa w bibliografii, obejmujących procedury wspomaganej komputerowo analizy, którą zaleca się stosować.

Stadium rozwojowe

35. Stadium rozwojowe kijanek *X. laevis* określa się, stosując kryteria oceny stadiów Nieuwkoopa i Fabera (8). Dane dotyczące stadium rozwojowego wykorzystuje się w celu określenia, czy rozwój jest przyspieszony, asynchroniczny, opóźniony, czy też nie ulega zmianie. Przyśpieszenie lub opóźnienie rozwoju jest określane przez porównanie mediany stadium w próbie kontrolnej i w grupach poddawanych badaniu. Rozwój asynchroniczny występuje wówczas, gdy badane tkanki nie mają wad rozwojowych lub nie są nieprawidłowe, ale odpowiedni przebieg morfogenezy lub rozwój różnych tkanek w czasie u pojedynczej kijanki są zakłócone.

Długość kończyn tylnych

36. Zróżnicowanie i rozwój kończyn tylnych są kontrolowane przez hormony tarczycy i stanowią główne charakterystyczne cechy rozwojowe wykorzystywane już do określania stadium rozwojowego. Rozwój kończyn tylnych jest wykorzystywany do jakościowej oceny stadium rozwojowego, ale tutaj uznawany jest za ilościowy punkt końcowy. W związku z tym długość kończyn tylnych mierzona jest jako punkt końcowy umożliwiający wykrycie wpływu na oś tarczycy (rys. 2). W celu zachowania spójności długość kończyn tylnych mierzy się na lewej kończynie tylnej. Długość kończyn tylnych ocenia się zarówno w 7. dniu, jak i w 21. dniu badania. W 7. dniu mierzenie długości kończyn tylnych jest proste, jak pokazano na rys. 2. Mierzenie długości kończyn tylnych w 21. dniu jest jednak bardziej skomplikowane ze względu na zagięcia kończyny. W związku z tym mierzenie długości kończyn tylnych w 21. dniu powinno rozpoczynać się przy korpusie i następnie wzdłuż środkowej linii kończyny, przechodząc przez wszystkie zgięcia. Zmiany długości kończyn tylnych w 7. dniu, nawet jeżeli nie są widoczne w 21. dniu, są nadal uznawane za znaczące ze względu na potencjalną czynność tarczycy. Pomiary długości pozyskuje się z cyfrowych fotografii, wykorzystując oprogramowanie przeznaczone do analizy obrazu, jak opisano w wytycznej OECD dotyczącej histologii tarczycy płazów (*Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology*) (9).

Długość ciała i masa mokra

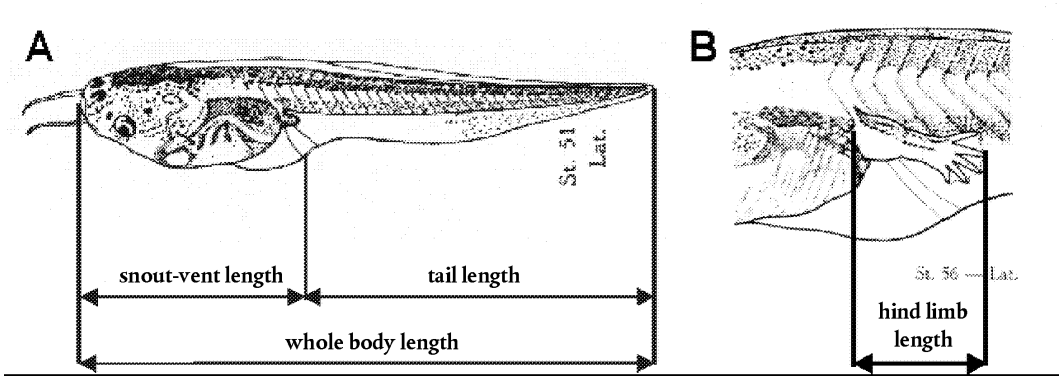
37. Oznaczenia długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu (rys. 2) i masy mokrej są zawarte w protokole badań służącym do oceny ewentualnych skutków badanych substancji chemicznych na wskaźnik wzrostu kijanek w porównaniu z grupą kontrolną i są przydatne w wykrywaniu toksyczności ogólnej badanej substancji chemicznej. Ponieważ wysuszenie wody chroniącej skórę kijanek w celu określenia masy może być dla kijanek stresujące oraz powodować uszkodzenie skóry, do pomiarów wykonywanych w 7. dniu wykorzystuje się podpróbę kijanek, a wszystkie pozostałe kijanki są mierzone w dniu zakończenia badania (21. dzień). W celu zachowania spójności do pomiaru należy wykorzystać punkt położony przeciwlegle do odbytu od strony czaszkowej jako graniczny punkt pomiaru od strony ogona.

38. Długość mierzoną od otworu gębowego do odbytu wykorzystuje się do oceny wzrostu, jak przedstawiono na rys. 2.

▼M6

Rysunek 2.

(A) Rodzaje pomiarów długości ciała oraz (B) pomiary długości kończyn tylnych w przypadku kijanek *X. laevis* (1).



Histologia gruczołu tarczowego

39. Chociaż stadium rozwojowe i długość kończyn tylnych stanowią istotne punkty końcowe pozwalające ocenić zmiany w rozwoju metamorficznym związane z narażeniem, opóźnienie w rozwoju nie może samo w sobie zostać uznane za diagnostyczny wskaźnik niekorzystnego oddziaływania na gruczoł tarczowy. Niektóre zmiany mogą zostać zauważone tylko w wyniku rutynowej analizy histopatologicznej. Kryteria diagnostyczne obejmują przerost/atrofię tarczycy, przerost komórek pęcherzykowych, hiperplazję komórek pęcherzykowych, a dodatkowe kryteria jakościowe obejmują światła pęcherzyka tarczycowego, jakość koloidu i wysokość/kształt komórek pęcherzykowych. Należy podać klasyfikację intensywności (4 stopnie). Informacje dotyczące uzyskiwania i przetwarzania próbek dla celów analiz histologicznych i dla celów przeprowadzania analiz histologicznych na próbkach tkanek są dostępne w wytycznych „Badanie przeobrażenia płazów: Część 1 – Wytyczne techniczne pobierania próbek morfologicznych i preparatyki histologicznej" (*Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 – Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation*) oraz „Badanie przeobrażenia płazów: Część 2 – Interpretacja badań, kryteria diagnostyczne, klasyfikacja intensywności i kręg szczytowy" (*Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 – Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas*) (9). Laboratoria przeprowadzające analizę po raz pierwszy powinny zwrócić się o radę do doświadczonych patologów w celu przeszkolenia, zanim przystąpią do analizy histologicznej i oceny tarczycy. Widoczne i znaczące zmiany szczytowych punktów końcowych wskazujące na przyspieszenie rozwoju lub rozwój asynchroniczny mogą wykluczyć konieczność przeprowadzenia analizy histopatologicznej tarczycy. Brak widocznych zmian morfologicznych lub dowodów opóźnień rozwojowych daje jednak podstawy do analiz histologicznych.

Śmiertelność

40. Należy codziennie sprawdzać wszystkie zbiorniki badawcze pod kątem martwych kijanek, których liczbę należy odnotować w odniesieniu do każdego zbiornika. W przypadku wykrycia każdego śmiertelnego przypadku należy odnotować datę, stężenie i numer zbiornika. Martwe zwierzęta należy usunąć ze zbiornika testowego natychmiast po ich zauważeniu. Wskaźnik śmiertelności powyżej 10 % może wskazywać na nieodpowiednie warunki badania lub toksyczny wpływ skutki badanej substancji chemicznej.

Dodatkowe obserwacje

41. Należy odnotować przypadki nietypowego zachowania oraz wyraźnie widocznych wad rozwojowych i uszkodzeń. Każdorazowo w przypadku stwierdzenia nietypowego zachowania, wyraźnie widocznych wad rozwojowych lub uszkodzeń należy odnotować datę, stężenie i numer

▼M6

zbiornika. Normalnie zachowujące się kijanki są zawieszone w słupie wody z ogonem wyżej niż głowa, ich płetwa ogonowa uderza regularnie i rytmicznie, okresowo wynurzają się na powierzchnię, poruszają pokrywami skrzelowymi i reagują na bodźce. Nietypowe zachowania obejmowałyby na przykład unoszenie się na powierzchni, leżenie na dnie zbiornika, pływanie brzuchem do góry lub w nieregularny sposób, brak wynurzania się na powierzchnię i brak reakcji na bodźce. Ponadto należy rejestrować wyraźne różnice w spożyciu pokarmu występujące między zabiegami. Wyraźnie widoczne wady rozwojowe i uszkodzenia mogą obejmować m.in. nieprawidłowości morfologiczne (np. zdeformowane kończyny), krwawiące uszkodzenia, zakażenia bakteryjne i grzybicze. Ustalenia te mają charakter jakościowy i powinno się je uważać za równoznaczne z klinicznymi objawami choroby/stresu oraz dokonywać, porównując ze zwierzętami z próby kontrolnej. Jeżeli występowanie lub częstotliwość występowania są większe w zbiorniku narażonym na działanie substancji chemicznej niż w próbach kontrolnych, należy je uznać za dowody widocznej toksyczności.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Gromadzenie danych

42. Wszystkie dane należy gromadzić przy użyciu systemów elektronicznych lub ręcznych, które są zgodne z dobrą praktyką laboratoryjną (GLP). Dane uzyskane w ramach badania powinny obejmować poniższe informacje.

Badana substancja chemiczna:

— charakterystyka badanej substancji chemicznej: właściwości fizykochemiczne; informacje dotyczące stabilności i biodegradowalności;

— informacje i dane dotyczące substancji chemicznej: metody i częstotliwości przygotowywania rozcieńczeń; informacje dotyczące badanej substancji chemicznej obejmują rzeczywiste i nominalne stężenia badanej substancji chemicznej oraz, w niektórych przypadkach, w razie potrzeby, niemacierzystej substancji chemicznej. Pomiary badanej substancji chemicznej mogą być wymagane w odniesieniu do roztworów podstawowych, jak również do roztworów do badań;

— rozpuszczalnik (jeżeli jest inny niż woda): uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika i charakterystyka rozpuszczalnika (charakter, wykorzystane stężenie).

Warunki badania:

— dokumentacja działań: zawiera obserwacje odnoszące się do funkcjonowania układu badawczego oraz wspierającego środowiska i infrastruktury; typowa dokumentacja obejmuje: temperaturę otoczenia, temperaturę badania, fotoperiod, status najważniejszych części układu narażenia (np. pompy, liczniki cyklów, ciśnienia), natężenia przepływu, stany wody, zmiany butelek laboratoryjnych i dokumentacja dotycząca żywienia; ogólne parametry jakości wody obejmują pH, stężenie rozpuszczonego tlenu, przewodność właściwą, łączną zawartość jodu, zasadowość i twardość;

— odchylenia od metody badawczej: te informacje powinny obejmować wszystkie informacje lub opisy odchyleń od metody badawczej.

Wyniki:

— obserwacje biologiczne i dane: obejmują one dzienne obserwacje śmiertelności, spożycia pokarmu, nietypowe zachowanie podczas pływania, letarg, utratę równowagi, wady rozwojowe, uszkodzenia itd. Obserwacje i dane zgromadzone w uprzednio ustalonych odstępach obejmują: stadia rozwojowe, długość kończyn tylnych, długość mierzoną od otworu gębowego do odbytu i masę mokrą;

▼M6

— zastosowane techniki statystyczno-analityczne i uzasadnienie zastosowanych technik, wyniki analizy statystycznej, najlepiej w formie tabeli;

— dane histologiczne: obejmują opisy, jak również stopnie ciężkości obserwowanych zmian i częstości ich występowania, jak szczegółowo przedstawiono w wytycznej dotyczącej histopatologii;

— obserwacje *ad hoc*: obserwacje te powinny obejmować opisy badania, które nie mieszczą się we wcześniej opisanych kategoriach.

Raportowanie danych

43. Dodatek 2 zawiera arkusze kalkulacyjne do codziennego gromadzenia danych, które można wykorzystać jako wytyczne dotyczące wprowadzania danych surowych i do obliczania statystyk podsumowujących. Dodatkowo dołączono tabele sprawozdawcze, które ułatwiają przekazywanie zestawień danych dotyczących punktów końcowych. Tabele sprawozdawcze dotyczące oceny histologicznej można znaleźć w dodatku 2.

Kryteria efektywności i akceptowalność/ważność badania

44. Na ogół wyraźne odchylenia od metody badawczej będą prowadziły do uzyskania danych, które będą nie do przyjęcia do celów interpretacji i sprawozdawczości. W związku z tym opracowano następujące kryteria, podane w tabeli 4, jako wytyczne w celu ustalenia jakości przeprowadzonego badania i ogólnej efektywności organizmów kontrolnych.

Tabela 4.

Kryteria efektywności dla badania przeobrażenia płazów.

Kryterium	Dopuszczalne granice
Badane stężenia	Utrzymane na poziomie ≤ 20 % współczynnika zmienności (zmienność mierzonego badanego stężenia) w trakcie 21 dni badania.
Śmiertelność w próbach kontrolnych	≤ 10 % – śmiertelność w dowolnej kontrpróbie w próbach kontrolnych nie powinna przekraczać 2 kijanek.
Minimalna mediana stadium rozwojowego w próbach kontrolnych na koniec badania	57
Rozkład stadium rozwojowego w grupie kontrolnej	10. i 90. percentyl rozkładu stadiów rozwojowych nie powinny różnić się o więcej niż 4 stadia.
Rozpuszczony tlen	≥ 40 % nasycenia powietrzem (*)
pH	pH należy utrzymać w przedziale 6,5–8,5. Różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny przekraczać 0,5.
Temperatura wody	22 ± 1 °C – różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny przekraczać 0,5 °C
Badane stężenia bez widocznej toksyczności	≥ 2
Wyniki kontrpróby	W całym badaniu zakłócenia mogą wystąpić w ≤ 2 kontrpróbach.

▼M6

Kryterium	Dopuszczalne granice
Szczególne warunki stosowania rozpuszczalnika	Jeżeli stosuje się nośnik rozpuszczalnikowy, należy zastosować próby kontrolne z rozpuszczalnikiem i próby kontrolne z czystą wodą, a wyniki należy zamieścić w sprawozdawaniu.
	Statystycznie istotne różnice między próbami kontrolnymi z rozpuszczalnikiem i próbami kontrolnymi z wodą traktuje się w sposób szczególny. Więcej informacji można znaleźć poniżej.
Szczególne warunki stosowania systemu wymiany statycznej	Reprezentatywne analizy chemiczne przed wymianą i po wymianie należy zamieścić w sprawozdaniu.
	Poziom amoniaku należy zmierzyć bezpośrednio przed wymianą.
	Wszystkie parametry jakości wody wymienione w tabeli 1 w dodatku 1 należy mierzyć bezpośrednio przed wymianą.
	Okres wymiany nie powinien przekraczać 72 godzin.
	Odpowiedni schemat żywienia (50 % dziennej dawki pokarmowej dostępnej w handlu paszy dla kijanek).

(*) Napowietrzanie wody można utrzymać za pomocą bełkotek. Zaleca się ustawianie bełkotek na poziomie, który nie powoduje nadmiernego stresu u kijanek.

Ważność badania

45. Aby badanie zostało zaakceptowane/uznane za ważne, powinno ono spełnić poniższe wymogi:

Ważny eksperyment w badaniu, którego wynik określono jako ujemny pod względem oddziaływania na gruczoł tarczowy:

(1) w odniesieniu do każdego zabiegu (łącznie z próbami kontrolnymi) śmiertelność nie może przekroczyć 10 %. W odniesieniu do każdej kontrpróby śmiertelność nie może przekroczyć trzech kijanek, w przeciwnym razie kontrpróbę uznaje się za zakłóconą;

(2) do analizy powinny być dostępne co najmniej dwa poziomy zabiegów ze wszystkimi czterema niezakłóconymi kontrpróbami;

(3) do analizy powinny być dostępne najmniej dwa poziomy zabiegów bez widocznej toksyczności.

Ważny eksperyment w badaniu, którego wynik określono jako dodatni pod względem oddziaływania na gruczoł tarczowy:

(1) w grupie kontrolnej śmiertelność nie może być większa niż dwie kijanki na kontrpróbę/grupę kontrolną.

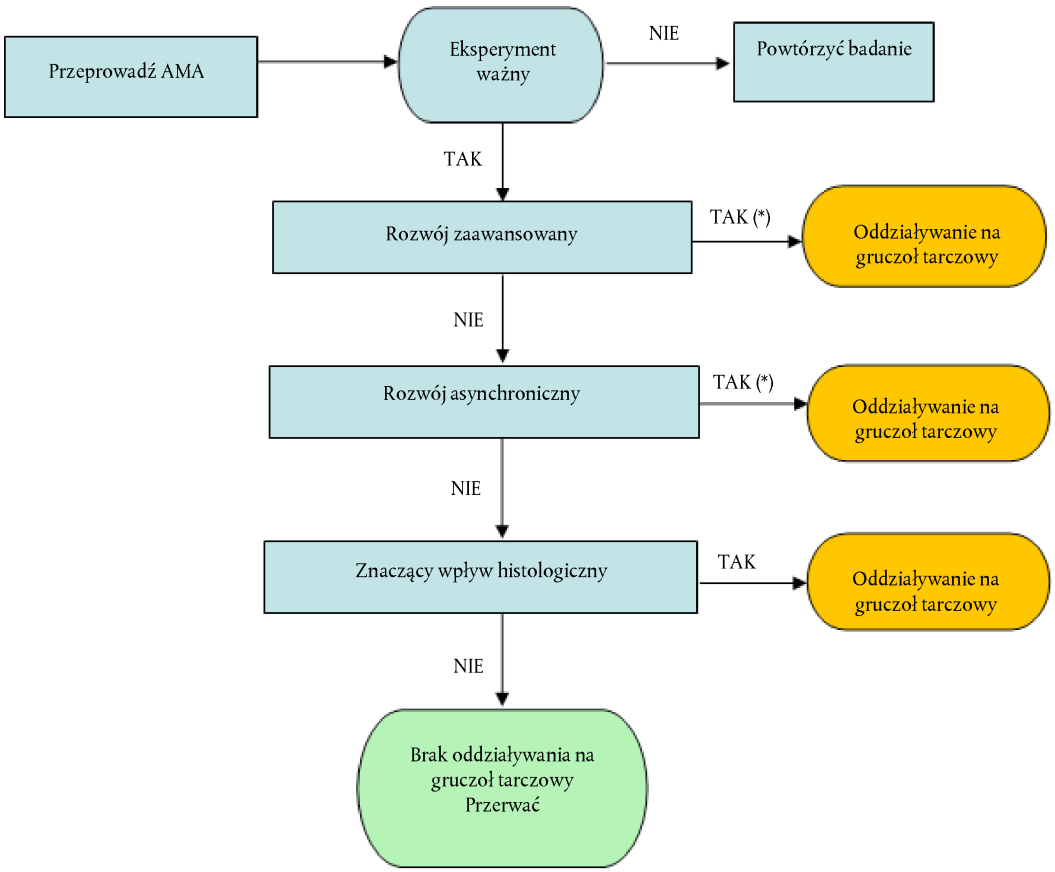
Schemat decyzyjny do przeprowadzenia badania przeobrażenia płazów (AMA)

46. Schemat decyzyjny został opracowany na potrzeby badania przeobrażenia płazów w celu zapewnienia logicznej pomocy przy wykonywaniu i interpretacji wyników testu biologicznego (zob. schemat blokowy na rys. 3). Zasadniczo w schemacie decyzyjnym przypisuje się wagę punktom końcowym, przy czym rozwojowi zaawansowanemu, rozwojowi asynchronicznemu i histopatologii tarczycy przypisuje się dużą wagę, natomiast rozwojowi opóźnionemu, długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu i mokrej masie ciała, czyli parametrom, na które może ewentualnie mieć wpływ toksyczność ogólna, przypisuje się mniejszą wagę.

▼M6

Rysunek 3.

Schemat decyzyjny na potrzeby badania przeobrażenia płazów (AMA)



(*) Niektóre organy regulacyjne mogą wymagać badania histologicznego mimo znaczących różnic między rozwojem zaawansowanym i asynchronicznym. Jednostkę przeprowadzającą to badanie zachęca się do zasięgnięcia opinii właściwych organów przed przeprowadzeniem badania w celu ustalenia wymaganych punktów końcowych.

Zaawansowany rozwój (określony na podstawie stadium rozwojowego, długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu i długości kończyn tylnych)

47. Wiadomo, że zaawansowany rozwój występuje wyłącznie w wyniku oddziaływań powiązanych z hormonem tarczycy. Mogą to być oddziaływania na tkanki obwodowe, takie jak bezpośrednia interakcja z receptorem hormonu tarczycy (takim jak T4) lub oddziaływania prowadzące do zmian poziomu hormonu tarczycy w układzie krążenia. W obu przypadkach uznaje się to za wystarczający dowód wskazujący, że substancja chemiczna oddziałuje na gruczoł tarczowy. Zaawansowany rozwój ocenia się na jeden z dwóch sposobów. Zgodnie z pierwszym sposobem ogólne stadium rozwojowe można ocenić, stosując metodę standardową, którą opisują szczegółowo Nieuwkoop i Faber (8). Drugi sposób polega na ilościowym określeniu cech morfologicznych, takich jak długość kończyn tylnych, w 7. i 21. dniu, co ma pozytywny związek z agonistycznym wpływem na receptor hormonu tarczycy. Jeżeli występuje istotne pod względem statystycznym przyspieszenie rozwoju lub zwiększenie długości kończyn tylnych, wówczas badanie wskazuje, że substancja chemiczna oddziałuje na gruczoł tarczowy.

▼**M6**

48. Ocena zwierząt użytych do badania pod kątem przyspieszonego rozwoju w odniesieniu do populacji kontrolnej będzie oparta na wynikach analiz statystycznych przeprowadzonych w odniesieniu do następujących czterech punktów końcowych:

— długości kończyn tylnych (znormalizowanej długością mierzoną od otworu gębowego do odbytu) w 7. dniu badania

— długości kończyn tylnych (znormalizowanej długością mierzoną od otworu gębowego do odbytu) w 21. dniu badania

— stadium rozwojowego w 7. dniu badania

— stadium rozwojowego w 21. dniu badania.

49. Analizy statystyczne długości kończyn tylnych należy przeprowadzać na podstawie pomiarów długości lewej kończyny tylnej. Długość kończyn tylnych normalizuje się, przyjmując stosunek długości kończyn tylnych do długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu osobnika. Następnie porównuje się średnią znormalizowanych wartości w odniesieniu do każdego poziomu zabiegu. Znaczące zwiększenie średniej długości (znormalizowanej) kończyn tylnych w badanej grupie poddawanej zabiegowi chemicznemu w porównaniu z grupą kontrolną w 7. lub 21. dniu badania wskazuje wówczas na przyspieszenie rozwoju (zob. dodatek 3).

50. Analizy statystyczne stadium rozwojowego należy przeprowadzać na podstawie ustalania stadiów rozwojowych zgodnie z kryteriami morfologicznymi, które opisują Nieuwkoop i Faber (8). Znaczące zwiększenie wartości stadium rozwojowego w badanej grupie poddawanej zabiegowi chemicznemu w porównaniu z grupą kontrolną w 7. lub 21. dniu badania, wykrytego w drodze analizy wielo-centylowej, wskazuje na przyspieszenie rozwoju.

51. W metodzie badania przeobrażenia płazów znacząca zmiana w którymś z wyżej wspomnianych punktów końcowych jest uznawana za wystarczającą dla wykrycia przyspieszonego rozwoju. Oznacza to, że znaczący wpływ na długość kończyn tylnych w danym momencie nie wymaga potwierdzenia przez znaczący wpływ na długość kończyn tylnych w innym momencie ani znaczący wpływ na stadium rozwojowe w tym danym momencie. Z kolei znaczący wpływ na stadium rozwojowe w danym momencie nie wymaga potwierdzenia przez znaczący wpływ na stadium rozwojowe w innym momencie ani przez znaczący wpływ na długość kończyn tylnych w tym danym momencie. Waga dowodów przyspieszonego rozwoju zwiększy się jednak, jeżeli znaczący wpływ zostanie wykryty w przypadku większej liczby punktów końcowych niż jeden.

Rozwój asynchroniczny (określony na podstawie kryteriów stadium rozwojowego)

52. Rozwój asynchroniczny charakteryzuje się zakłóceniem przebiegu morfogenezy w czasie lub rozwoju różnych tkanek u pojedynczej kijanki. Niezdolność do wyraźnego ustalenia stadium rozwoju organizmu z wykorzystaniem ciągu morfologicznych punktów końcowych uznawanych za typowe dla danego stadium wskazuje, że tkanki rozwijają się asynchronicznie podczas przemiany. Rozwój asynchroniczny stanowi wskaźnik oddziaływania na gruczoł tarczowy. Jedyne znane działanie wywołujące rozwój asynchroniczny polega na wpływie substancji chemicznych na obwodowe działanie hormonu tarczycy lub na metabolizm hormonu tarczycy w rozwijających się tkankach, który obserwuje się na przykład dla inhibitorów dejodynazy.

▼**M6**

53. Ocena zwierząt użytych do badania pod kątem rozwoju asynchronicznego w odniesieniu do populacji kontrolnej będzie oparta na bezpośredniej ocenie morfologicznej badanych zwierząt w 7. i 21. dniu badania.

54. Opis prawidłowego rozwoju *Xenopus laevis* u Nieuwkoopa i Fabera (8) stanowi ramy identyfikacji kolejności prawidłowej przebudowy tkanek. Termin „rozwój asynchroniczny" odnosi się konkretnie do tych odchyleń w ogólnym rozwoju morfologicznym kijanek, które uniemożliwiają ostateczne ustalenie stadium rozwoju zgodnie z kryteriami Nieuwkoopa i Fabera (8), ponieważ kluczowe charakterystyczne cechy morfologiczne wykazują właściwości różnych stadiów.

55. Jak wskazuje termin „rozwój asynchroniczny", należy uwzględniać tylko przypadki wykazujące odchylenia w postępie przebudowy konkretnych tkanek względem postępu przebudowy innych tkanek. U niektórych klasycznych fenotypów występuje opóźnienie w pojawieniu się kończyn przednich lub ich brak mimo prawidłowego lub zaawansowanego rozwoju tkanek kończyn tylnych i ogona lub wczesna resorpcja skrzeli w stosunku do stadium morfogenetycznego kończyn tylnych i resorpcji ogona. Zwierzę zostanie zarejestrowane jako rozwijające się asynchronicznie, jeżeli nie można przypisać go do stadium, ponieważ nie spełnia większości kryteriów rozwojowych dotyczących charakterystycznych punktów w odniesieniu do danego stadium Nieuwkoopa i Fabera (8) lub jeżeli występuje skrajne opóźnienie lub przyspieszenie wystąpienia co najmniej jednej kluczowej cechy (np. ogon całkowicie resorbowany, ale kończyny przednie nie powstały). Ocena ta przeprowadzana jest w sposób jakościowy i powinna umożliwić zbadanie pełnego ciągu charakterystycznych cech wymienionych przez Nieuwkoopa i Fabera (8). Nie jest jednak konieczne rejestrowanie stanu rozwoju różnych cech charakterystycznych obserwowanych zwierząt. Zwierzęta zarejestrowane jako wykazujące rozwój asynchroniczny nie są przypisane do stadium rozwojowego Nieuwkoopa i Fabera (8).

56. W związku z tym głównym kryterium wyznaczania przypadków nieprawidłowego rozwoju morfologicznego jako przypadków „rozwoju asynchronicznego" jest zakłócenie odpowiedniego przebieg przebudowy tkanek i morfogenezy tkanek w czasie, przy czym morfologia narażonych tkanek nie wykazuje wyraźnych nieprawidłowości. Jednym z przykładów ilustrujących tę interpretację ogólnych nieprawidłowości morfologicznych jest to, że opóźniona morfogeneza kończyn tylnych w stosunku do rozwoju innych tkanek spełni kryterium „rozwoju asynchronicznego", natomiast przypadki braku kończyn tylnych, nieprawidłowej liczby kończyn (np. ektrodaktylia, polidaktylia) lub występowanie innych wyraźnych wad rozwojowych kończyn nie powinny być traktowane jako przypadki „rozwoju asynchronicznego".

57. W tym kontekście główne morfologiczne cechy charakterystyczne, które należy ocenić pod kątem ich skoordynowanego rozwoju metamorficznego, powinny obejmować morfogenezę kończyn tylnych, morfogenezę kończyn przednich, powstanie kończyn przednich, etap resorpcji ogona i morfologię głowy (np. rozmiar skrzeli i etap resorpcji skrzeli, morfologię dolnej szczęki, wystawanie chrząstki Meckela).

58. W zależności od charakteru działania substancji chemicznej mogą wystąpić różne ogólne fenotypy morfologiczne. U niektórych klasycznych fenotypów występuje brak kończyn przednich lub opóźnienie w ich pojawieniu się pomimo prawidłowego lub zaawansowanego rozwoju tkanek kończyn tylnych i ogona lub wczesnej resorpcji skrzeli w stosunku do przebudowy kończyn tylnych i ogona.

▼M6

Histopatologia

59. Jeżeli substancja chemiczna nie powoduje widocznej toksyczności i nie przyspiesza rozwoju ani nie powoduje rozwoju asynchronicznego, ocenia się histopatologię tarczycy kierując się odpowiednimi wytycznymi (9). Opóźnienie rozwojowe przy braku toksyczności stanowi wyraźny wskaźnik niekorzystnego oddziaływania na gruczoł tarczowy, analiza stadium rozwojowego jest jednak mniej wrażliwa i charakteryzuje się słabszą diagnostyką niż analiza histopatologiczna tarczycy. W związku z tym przeprowadzanie analiz histopatologicznych tarczycy jest w tym przypadku wymagane. Zmiany w histologii tarczycy zostały wykazane przy braku zmian rozwojowych. Jeżeli występują zmiany w histopatologii tarczycy, uważa się, że substancja chemiczna oddziałuje na gruczoł tarczowy. Jeżeli nie zaobserwuje się żadnych opóźnień rozwojowych ani uszkodzeń histologicznych w tarczycy, uważa się, że substancja chemiczna nie oddziałuje na gruczoł tarczowy. Uzasadnienie tej decyzji jest takie, że na gruczoł tarczowy wpływa TSH i każda substancja chemiczna, która wpływa na poziom hormonu tarczycy w układzie krążenia w wystarczającym stopniu, aby zmienić wydzielanie TSH, wywoła zmiany histopatologiczne w tarczycy. Różne tryby i mechanizmy działania mogą powodować zmiany poziomu hormonu tarczycy w układzie krążenia. Tak więc chociaż poziom hormonu tarczycy wskazuje na zmiany związane z tarczycą, nie wystarczy określić, który tryb czy mechanizm działania jest związany z tą reakcją.

60. W związku z tym, że do tego punktu końcowego nie da się zastosować podstawowych metod statystycznych, określenie wpływu związanego z narażeniem na substancję chemiczną powinno nastąpić w oparciu o ekspertyzę patologa.

Rozwój opóźniony (określony na podstawie kryteriów stadium rozwojowego, długości kończyn tylnych, masy ciała, długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu)

61. Opóźniony rozwój może być spowodowany przez mechanizmy antytyroidowe i przez toksyczność pośrednią. Lekkie opóźnienia rozwojowe połączone z widocznymi oznakami toksyczności prawdopodobnie wskazują na niespecyficzne działanie toksyczne. Ocena toksyczności pozatarczycowej stanowi istotną część badania mającego na celu zmniejszenie prawdopodobieństwa fałszywie dodatnich wyników. Nadmierna śmiertelność stanowi oczywiste wskazanie, że występują inne toksyczne mechanizmy. Podobnie umiarkowane zmniejszenie wzrostu, określone przez masę mokrą lub długość mierzoną od otworu gębowego do odbytu, również wskazuje na toksyczność pozatarczycową. Widoczne przyspieszenia wzrostu obserwuje się powszechnie w przypadku substancji chemicznych, które mają negatywny wpływ na prawidłowy rozwój. W związku z tym obecność większych osobników nie musi wskazywać na toksyczność pozatarczycową. W celu określenia toksyczności tarczycowej nie należy jednakże polegać wyłącznie na wzroście. Należy raczej wykorzystywać wzrost w połączeniu ze stadium rozwojowym i histopatologią tarczycy w celu określenia oddziaływania na gruczoł tarczowy. Przy określaniu widocznej toksyczności należy raczej uwzględniać również inne punkty końcowe, takie jak obrzęk, uszkodzenia krwotoczne, letarg, ograniczone spożycie pokarmu, nieskoordynowane ruchy lub zmienione zachowanie podczas pływania itp. Jeżeli wszystkie badane stężenia wykazują oznaki widocznej toksyczności, badana substancja chemiczna powinna zostać poddana ponownej ocenie przy niższych badanych stężeniach, zanim określi się, czy ta substancja chemiczna potencjalnie oddziałuje na tarczycę, czy nie.

62. Przy braku innych oznak wyraźnej toksyczności istotne statystycznie opóźnienia rozwojowe wskazują, że substancja chemiczna oddziałuje na tarczycę (działanie antagonistyczne). Przy braku istotnych statystycznie reakcji wynik ten może zostać poszerzony o wyniki z histopatologii tarczycy.

▼M6

Analizy statystyczne

63. Statystyczne analizy danych najlepiej jest wykonywać zgodnie z procedurami opisanymi w dokumencie „Aktualne podejście do statystycznej analizy danych ekotoksyczności: wytyczne stosowania” (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (11). W przypadku wszystkich ciągłych ilościowych punktów końcowych (długości kończyn tylnych, długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu, masy mokrej) zgodnych z monotoniczną zależnością dawka-odpowiedź należy zastosować regresyjny test Jonckheere'a-Terpstry w celu ustalenia istotnego wyniku zabiegu.

64. W przypadku ciągłych punktów końcowych, które nie są zgodne z monotoniczną zależnością dawka-odpowiedź, dane należy oceniać pod kątem normalności (preferuje się stosowanie testu Shapiro-Wilka lub testu Andersona-Darlinga) i jednorodności wariancji (preferuje się stosowanie testu Levene'a). Oba testy przeprowadza się na resztach ANOVA. Zamiast tych formalnych badań normalności i jednorodności wariancji można oprzeć się na swojej najlepszej wiedzy, jednak preferowane są badania formalne. W przypadku stwierdzenia odchylenia od normy lub niejednorodności wariancji, należy dążyć do transformacji normalizującej i stabilizującej wariancję. Jeżeli dane (na przykład po transformacji) mają rozkład normalny o jednorodnej wariancji, określa się istotny wynik zabiegu na podstawie testu Dunnetta. Jeżeli dane (na przykład po transformacji) posiadają rozkład normalny o niejednorodnej wariancji, określa się istotny wynik zabiegu na podstawie testu Tamhane'a-Dunnetta albo testu T3 lub testu U Manna-Whitmana-Wilcoxona. W przypadku gdy nie można ustalić żadnej normalizującej transformacji, istotny wynik zabiegu określa się na podstawie testu U Manna-Whitneya-Wilcoxona z wykorzystaniem dopasowania wartośći p Bonferroniego-Holma. Test Dunnetta stosuje się niezależnie od testu ANOVA F, a test Manna-Whitneya stosuje się niezależnie od ogólnego testu Kruskalla-Wallisa.

65. Nie przewiduje się istotnej śmiertelności, należy ją jednak ocenić na podstawie regresyjnego testu Cochrana-Armitage'a, gdzie dane są zgodne z monotonicznością zależności dawka-odpowiedź, a w innych przypadkach z dokładnym testem Fischera z dopasowaniem Bonferroniego-Holma.

66. Istotny wynik zabiegu dla stadium rozwojowego określa się na podstawie regresyjnego testu Jonckheere'a-Terpstry zastosowanego do median kontrprób. Ewentualnie lepiej jest zastosować wielocentylowy test Jonckheere'a od 20. do 80. percentyla do określenia wyniku, ponieważ uwzględnia się w nim zmiany w profilu rozmieszczenia.

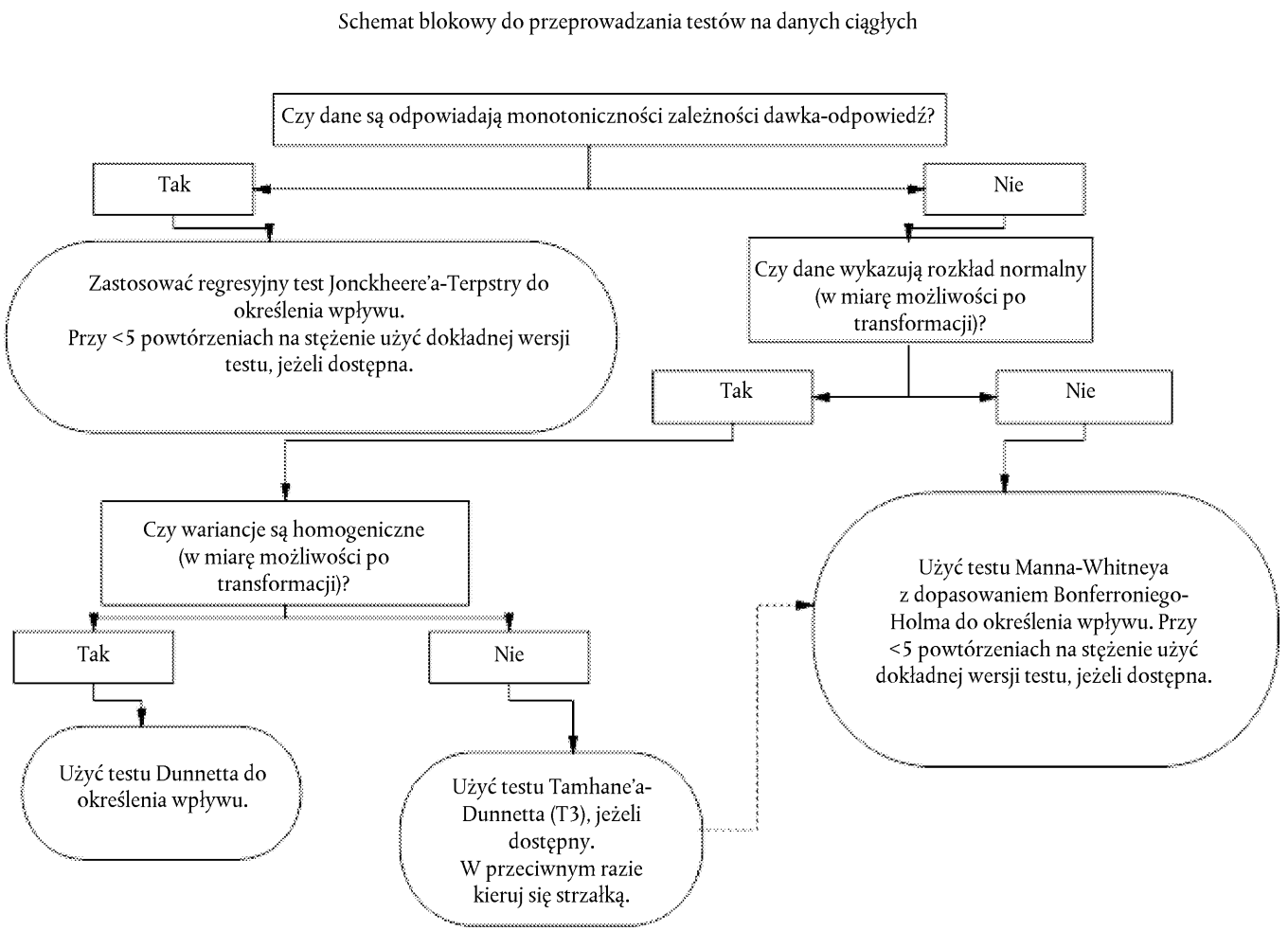
67. Właściwą jednostką analizy jest kontrpróba, zatem dane składają się z median kontrprób w przypadku zastosowania testu Jonckheere'a-Terpstry lub testu U Manna-Whitneya lub ze średnich kontrprób, jeżeli stosuje się test Dunnetta. Monotoniczność zależności dawka-odpowiedź można ocenić wzrokowo na podstawie średnich lub median kontrpróby i zabiegu lub na podstawie testów formalnych, takich jak opisane powyżej (11). Przy liczbie kontrprób na zabieg lub próbę kontrolną mniejszej niż pięć należy zastosować wersje dokładnych permutacji tekstów Jonckheere'a-Terpstry i Manna-Whitneya, jeżeli są one dostępne. Poziom istotności statystycznej wszystkich wskazanych testów ocenia się na poziomie istotności 0,05.

68. Rysunek 4 przedstawia schemat blokowy do przeprowadzania testów statystycznych na danych ciągłych.

▼M6

Rysunek 4.

Schemat blokowy przedstawiający statystyczne metody w odniesieniu do danych będących zmiennymi ciągłymi.



▼M6

Szczególne warunki analizy danych

Wykorzystanie zakłóconych poziomów zabiegu

69. Przy ustalaniu, czy kontrpróba lub cały zabieg wykazują wyraźną toksyczność i powinny zostać usunięte z analizy, należy uwzględnić kilka czynników. Wyraźną toksyczność definiuje się jako śmiertelność w dowolnej kontrpróbie > 2, którą można wyjaśnić wyłącznie toksycznością, a nie błędem technicznym. Inne oznaki wyraźnej toksyczności to krwotok, nietypowe zachowania, nietypowe wzorce pływania, brak łaknienia i wszelkie inne kliniczne objawy choroby. W przypadku subletalnych objawów toksyczności niezbędne mogą być oceny jakościowe, które zawsze należy przeprowadzać w odniesieniu do grupy kontrolnej z czystą wodą.

Próby kontrolne z rozpuszczalnikiem

70. Użycie rozpuszczalnika należy brać pod uwagę tylko w ostateczności, po uwzględnieniu wszystkich innych opcji wprowadzenia substancji chemicznej. W przypadku zastosowania rozpuszczalnika należy jednocześnie wykonać próbę kontrolną z czystą wodą. Na zakończenie badania należy przeprowadzić ocenę potencjalnego wpływu rozpuszczalnika. Dokonuje się tego porównując statystycznie grupę kontrolną z rozpuszczalnikiem i grupę kontrolną z czystą wodą. Najbardziej właściwe punkty końcowe, które należy uwzględnić w tej analizie, to stadium rozwojowe, długość mierzona od otworu gębowego do odbytu i masa mokra, które mogą zmienić się pod wpływem toksyczności pozatarczycowej. Jeżeli w tych punktach końcowych wykryje się statystycznie istotne różnice między grupą kontrolną z czystą wodą i grupą kontrolną z rozpuszczalnikiem, należy określić punkty końcowe dla zmierzonych wielkości reakcji z wykorzystaniem próby kontrolnej z czystą wodą. Jeżeli nie istnieje żadna statystycznie istotna różnica między próbą kontrolną z czystą wodą i próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem dla wszystkich zmierzonych zmiennych wielkości reakcji, należy określić punkty końcowe badania w odniesieniu do pomiarów wielkości reakcji, wykorzystując w tym celu połączone próby kontrolne z wodą rozcieńczającą i próby kontrolne z rozpuszczalnikiem.

Grupy badane poddane zabiegowi osiągające 60. stadium rozwoju i wyższe

71. Po 60. stadium rozwoju następuje zmniejszenie wymiarów i wagi kijanek ze względu na resorpcję tkanek i zmniejszenie bezwzględnej zawartości wody w ich organizmie. Zatem nie można odpowiednio wykorzystywać pomiarów masy mokrej i długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu w analizach statystycznych, których przedmiotem są różnice w tempie wzrostu. W związku z tym dane dotyczące masy mokrej i długości organizmów > NF60 należy odciąć i nie można wykorzystywać ich do analiz średnich lub median kontrprób. Do analizy tych dwóch parametrów związanych ze wzrostem można zastosować dwa różne podejścia.

72. Jedno podejście polega na uwzględnieniu wyłącznie kijanek w stadiach rozwojowych niższych lub równych 60. stadium dla celów analiz statystycznych masy mokrej lub długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu. Uważa się, że podejście to zapewnia uzyskanie wystarczająco szczegółowych informacji na temat intensywności możliwych zmian wzrostu, jeżeli z analiz usuwa się tylko niewielką część zwierząt użytych do badania (≤ 20 %). Jeżeli większa liczba kijanek wykazuje rozwój wykraczający poza 60. stadium (≥ 20 %) w co najmniej jednym stężeniu nominalnym, w odniesieniu do wszystkich kijanek należy zastosować dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) o zagnieżdżonej strukturze wariancji w celu dokonania oceny wpływu zabiegów chemicznych na wzrost, uwzględniając wpływ zaawansowanego stadium rozwoju na wzrost. Dodatek 3 przedstawia wytyczne dotyczące dwuczynnikowej analizy ANOVA masy i długości.

BIBLIOGRAFIA

(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. Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa środowiskowego. Seria dotycząca badań i oceny, nr 77, Paryż.

▼**M6**

(2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa środowiskowego. Seria dotycząca badań i oceny, nr 76, Paryż.

(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. Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa środowiskowego. Seria dotycząca badań i oceny, nr 92, Paryż.

(4) OECD (2000): Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa środowiskowego. Seria dotycząca badań i oceny, nr 23, Paryż.

(5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów, ASTM E729-96(2002), Filadelfia, 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. i Hammermeister, D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, s. 539–551.

(8) Nieuwkoop, P.D. i Faber, J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, Nowy Jork.

(9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa środowiskowego. Seria dotycząca badań i oceny, nr 82, Paryż.

(10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (red.), Academic Press, Nowy Jork, s. 467-599

(11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa środowiskowego. Seria dotycząca badań i oceny, nr 54, Paryż.

(12) Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; ss. 69–92.

▼M6

Dodatek 1

Tabela 1

Warunki doświadczalne dla 21-dniowego badania przeobrażenia płazów

Zwierzę użyte do badania		Larwy *Xenopus laevis*	
Etap: początkowe stadium larwalne		51. stadium Nieuwkoopa i Fabera	
Okres narażenia		21 dni	
Kryteria wyboru larw		Stadium rozwojowe i długość całkowita (opcjonalnie)	
Badane stężenia		Co najmniej 3 stężenia obejmujące w przybliżeniu jeden rząd wielkości	
System narażenia		Przepływowy (preferowany) lub wymiana statyczna	
Prędkość przepływu układu badawczego		25 ml/min. (pełna wymiana objętości co ok. 2,7 h)	
Podstawowe parametry docelowe/ dni określania		Śmiertelność	Codziennie
		Stadium rozwojowe	7. i 21. dzień
		Długość kończyn tylnych	7. i 21. dzień
		Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu:	7. i 21. dzień
		Mokra masa ciała	7. i 21. dzień
		Histologia tarczycy	21. dzień
Woda rozcieńczająca/ laboratoryjna próba kontrolna		Odchlorowana woda wodociągowa (filtrowana na węglu aktywnym) lub woda laboratoryjna o równoważnych właściwościach	
Zagęszczenie larw		20 larw na naczynie badawcze (5/l)	
Roztwór do badań/ naczynie badawcze		4–10 l (minimalny poziom wody 10–15 cm) / naczynie badawcze ze szkła lub stali nierdzewnej (np. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Kontrpróby		4 naczynia badawcze z kontrpróbą/ badane stężenie i próba kontrolna	
Akceptowalny wskaźnik śmiertelności w próbach kontrolnych		≤ 10 % na naczynie badawcze z kontrpróbą	
Utrwalenie tarczycy	Utrwalona liczba	Wszystkie kijanki (początkowo ocenia się 5 na kontrpróbę)	
	Strefa	Głowa lub całe ciało	
	Płyn utrwalający	Utrwalacz Davidsona	
Karmienie	Pokarm	Sera Micron® lub równoważny	
	Ilość / Częstotliwość	Zob. tabela 1 dotycząca schematu żywienia przy wykorzystaniu Sera Micron®	
Oświetlenie	Fotoperiod	12 h światła: 12 h ciemności	

▼**M6**

	Intensywność	600– 2 000 luksów (mierzone na powierzchni wody)
Temperatura wody		22 ± 1 °C
pH		6,5 – 8,5
Stężenie rozpuszczonego tlenu (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % nasycenia powietrzem)
Harmonogram analiz chemicznych próby		Raz na tydzień (4 pobrania/badanie)

▼M6

Dodatek 2

Tabele sprawozdawcze do gromadzenia danych surowych i zestawień danych

Tabela 1

Informacje ogólne na temat badanej substancji chemicznej

Informacje dotyczące substancji chemicznej:			
	Podać badaną substancję chemiczną, jednostki stężenia i zabiegi		
	Badana substancja chemiczna:		
	Jednostki stężenia:		
	Zabieg 1		
	Zabieg 2		
	Zabieg 3		
	Zabieg 4		
	Data (dzień 0):		Podać datę (dd/mm/yy)
	Data (dzień 7):		Podać datę (dd/mm/yy)
	Data (dzień 21):		Podać datę (dd/mm/yy)

Tabela 2

Arkusze do gromadzenia danych surowych z 7. i 21. dnia

DZIEŃ X
DATA: 00/00/00

	Stężenie	Numer zabiegu	Numer kontrpróby	Numer osobnika	Identyfi-kator osobnika	Stadium rozwojowe	Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu (mm)	Długość kończyn tylnych (mm)	Mokra masa całego organizmu (mg)
WIERSZ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIUM	BL	Długość kończyn tylnych	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**

	Stężenie	Numer zabiegu	Numer kontrpróby	Numer osobnika	Identyfikator osobnika	Stadium rozwojowe	Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu (mm)	Długość kończyn tylnych (mm)	Mokra masa całego organizmu (mg)
WIERSZ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIUM	BL	Długość kończyn tylnych	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**

	Stężenie	Numer zabiegu	Numer kontrpróby	Numer osobnika	Identyfi-kator osobnika	Stadium rozwojowe	Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu (mm)	Długość kończyn tylnych (mm)	Mokra masa całego organizmu (mg)
WIERSZ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIUM	BL	Długość kończyn tylnych	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**

	Stężenie	Numer zabiegu	Numer kontrpróby	Numer osobnika	Identyfi-kator osobnika	Stadium rozwojowe	Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu (mm)	Długość kończyn tylnych (mm)	Mokra masa całego organizmu (mg)
WIERSZ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIUM	BL	Długość kończyn tylnych	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**

Tabela 3

Obliczone zestawienia danych dotyczących punktów końcowych z 7. i 21. dnia

		Stadium rozwojowe			Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu (mm)		Długość kończyn tylnych (mm)		Masa (mg)	
TRT	REP	MIN	MEDIANA	MAX	ŚREDNIA	ODCHYLENIE STANDARDOWE	ŚREDNIA	ODCHYLENIE STANDARDOWE	ŚREDNIA	ODCHYLENIE STANDARDOWE
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!

Uwaga: wartości obliczone w komórkach są powiązane z danymi wprowadzonymi do tabeli 2.

Tabela 4

Dzienne dane dotyczące śmiertelności

Dzień badania	Data	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**

Dzień badania	Data	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!																
Liczba kontrprób		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liczba zabiegów		0				0				0				0			

Uwaga: wartości obliczone w komórkach są powiązane z danymi wprowadzonymi do tabeli 1.

Tabela 5

Kryteria jakości wody

Układ narażenia (przepływowy/wymiana statyczna):
Temperatura:
Natężenie światła:
Cykl światło/ciemność:
Pokarm:
Częstotliwość karmienia:
pH wody:
Stężenie jodu w wodzie użytej do badania:

▼**M6**

Tabela 6

Podsumowanie danych chemicznych

Nazwa systematyczna:																					
Nr CAS:																					
Dzień badania	Data	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!																				

Uwaga: wartości obliczone w komórkach są powiązane z danymi wprowadzonymi do tabeli 1.

▼**M6**

Tabela 7

Histopatologiczne tabele sprawozdawcze dotyczące podstawowych kryteriów

Data: Substancja chemiczna: Patolog:

Identyfikator zwierzęcia z próby kontrolnej – kontrpróba 1	Identyfikator zwierzęcia z próby kontrolnej – kontrpróba 2	Przerost gruczołu tarczowego	Atrofia gruczołu tarczowego	Przerost komórek pęcherzykowych	Hiperplazja komórek pęcherzykowych
Ogółem:					

Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 1	Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 2	Przerost gruczołu tarczowego	Atrofia gruczołu tarczowego	Przerost komórek pęcherzykowych	Hiperplazja komórek pęcherzykowych
Ogółem:					

Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 1	Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 2	Przerost gruczołu tarczowego	Atrofia gruczołu tarczowego	Przerost komórek pęcherzykowych	Hiperplazja komórek pęcherzykowych
Ogółem:					

▼**M6**

Tabela 8

Dodatkowe kryteria histopatologiczne

Data: Substancja chemiczna: Patolog:

Identyfikator zwierzęcia z próby kontrolnej – kontrpróba 1	Identyfikator zwierzęcia z próby kontrolnej – kontrpróba 2	Powiększenie światła pęcherzyka tarczycowego	Zmniejszenie światła pęcherzyka tarczycowego
Ogółem:			

Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 1	Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 2	Powiększenie światła pęcherzyka tarczycowego	Zmniejszenie światła pęcherzyka tarczycowego
Ogółem:			

Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 1	Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 2	Powiększenie światła pęcherzyka tarczycowego	Zmniejszenie światła pęcherzyka tarczycowego
Ogółem:			

Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 1	Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 2	Powiększenie światła pęcherzyka tarczycowego	Zmniejszenie światła pęcherzyka tarczycowego
Ogółem:			

▼**M6**

Tabela 9

Opis wyników badań histopatologicznych

Data:

Substancja chemiczna:

Patolog:

		Opis
Identyfikator zwierzęcia z próby kontrolnej – kontrpróba 1		
Identyfikator zwierzęcia z próby kontrolnej – kontrpróba 2		
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 1		
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 2		

▼**M6**

Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 1		
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 2		
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 1		
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania – kontrpróba 2		

▼M6

Tabela 10

Wzór zbiorczej tabeli sprawozdawczej w odniesieniu do dnia x (7 lub 21) badania przeobrażenia płazów

		Próba kontrolna				Dawka 1					Dawka 2					Dawka 3				
Punkt końcowy	Kontrpróba	Średnia	SD	CV	N	Średnia	SD	CV	N	wartość p	Średnia	SD	CV	N	wartość p	Średnia	SD	CV	N	wartość p
Długość kończyn tylnych (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Średnia:																			
Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu (SVL) (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Średnia:																			
Masa mokra (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Średnia:																			

02008R0440 — PL — 16.10.2019 — 008.001 — 2238

▼M6

Tabela 11

Wzór zbiorczej tabeli sprawozdawczej w odniesieniu do danych dotyczących stadium rozwojowego z dnia x (7. lub 21.) badania przeobrażenia płazów (AMA)

		Próba kontrolna				Dawka 1					Dawka 2					Dawka 3				
	Kontrpróba	Mediana	Min	Maks	N	Mediana	Min	Maks	N	wartość p	Mediana	Min	Maks	N	wartość p	Mediana	Min	Maks	Mediana	wartość p
Stadium rozwojowe	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Średnia:																			

▼M6

Dodatek 3

Alternatywna analiza masy i długości w przypadku zaawansowanego stadium rozwoju u ponad 20 % kijanek w co najmniej jednym stężeniu

Jeżeli większa liczba kijanek wykazuje tendencje rozwojowe wykraczające poza 60. stadium (≥ 20 %) w co najmniej jednym stężeniu nominalnym, w odniesieniu do wszystkich kijanek należy zastosować dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) o zagnieżdżonej strukturze wariancji w celu dokonania oceny wpływu zabiegów chemicznych na wzrost, uwzględniając wpływ zaawansowanego stadium rozwoju na wzrost.

Proponuje się wykorzystanie wszystkich danych, uwzględniając wpływ zaawansowanego stadium rozwoju. Można tego dokonać za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA o zagnieżdżonej strukturze wariancji. W pozycji LateStage podać „tak” w odniesieniu do zwierzęcia, jeżeli jego stadium rozwojowe to co najmniej 61. stadium. W przeciwnym razie w pozycji LateStage podać „nie”. Następnie można wykonać dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA obejmującą stężenie i pozycję LateStage oraz ich interakcję, przyjmując czynnik losowy Rep(Conc) i inny efekt losowy Tadpole(Rep). Rep jest tu jeszcze traktowane jako jednostka analizy i zasadniczo pozwala na osiągnięcie takich samych wyników jak ważona analiza wartości średnich rep*latestage, ważona liczbą zwierząt w stosunku do wartości średniej. Jeżeli dane naruszają wymogi normalności lub jednorodności analizy wariancji ANOVA, można wykonać znormalizowaną transformację hierarchii, aby pozbyć się tego zastrzeżenia.

Oprócz standardowych testów F ANOVA w odniesieniu do efektów Conc, LateStage i ich interakcji, test F interakcji można podzielić na dwa dodatkowe testy F ANOVA, jeden dotyczący średnich reakcji w poszczególnych stężeniach w odniesieniu do LateStage=„nie” i drugi dotyczący średnich reakcji w poszczególnych stężeniach w odniesieniu do LateStage=„tak”. Dalsze porównania średnich z grup poddawanych zabiegowi z próbą kontrolną wykonuje się w ramach każdego poziomu zaawansowanego stadium. Analizę trendu można wykonać, stosując odpowiednie przeciwieństwa, lub można dokonać zwykłego porównania par, jeżeli istnieją dowody niemonotonnej zależności dawka-odpowiedź w ramach poziomu zmiennej stadium zaawansowanego. Korekty wartości p metodą Bonferroniego-Holma dokonuje się jedynie wówczas, gdy odpowiednia część F rozkładu nie jest znacząca. Można dokonać tego za pomocą systemu SAS oraz przypuszczalnie za pomocą innych pakietów oprogramowania statystycznego. Komplikacje mogą pojawić się w przypadku gdy w niektórych stężeniach nie występują zwierzęta w zaawansowanym stadium rozwoju, ale z takimi sytuacjami można jednak poradzić sobie w zwykły sposób.

▼**M6**

Dodatek 4

Definicje

Substancja chemiczna: oznacza substancję lub mieszaninę.

Badana substancja chemiczna: oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

▼M6

C.39. BADANIE ROZRODCZOŚCI SKOCZOGONKÓW (*COLLEMBOLA*) W GLEBIE

WPROWADZENIE

1. Opisywana metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 232 (2009 r.) w sprawie badań. Metoda ma na celu dokonanie oceny wpływu substancji chemicznych na zdolność rozrodczą skoczogonków w glebie. Jest ona oparta na obowiązujących procedurach (1) (2). Partenogenetyczne *Folsomia candida* i rozmnażające się płciowo *Folsomia fimetaria* stanowią dwa najbardziej dostępne gatunki skoczogonków, które dają się hodować i są dostępne na rynku. Jeżeli ma być dokonana ocena określonych siedlisk, w których nie występują wspomniane dwa gatunki, procedurą można również objąć inne gatunki skoczogonków, jeżeli są w stanie spełnić kryteria ważności badania.

2. Żyjące w glebie skoczogonki są gatunkiem istotnym pod względem ekologicznym dla badań ekotoksykologicznych. Skoczogonki to sześcionogi z cienkim egzoszkieletem o wysokiej przepuszczalności powietrza i wody, reprezentujące gatunek stawonogów o innej drodze i stopniu narażenia niż dżdżownice i wazonkowce.

3. Zagęszczenie populacji skoczogonków w glebie i warstwach opadłych liści wielu ekosystemów lądowych zwykle osiąga 10^5 m^{-2} (3) (4). Dorosłe osobniki zwykle mierzą 0,5–5 mm, ich udział w całkowitej biomasie glebowej i zwierzęcej oraz w respiracji jest niski, szacowany na 1–5 % (5). W związku z tym ich najważniejszą rolę może stanowić funkcjonowanie w charakterze potencjalnych regulatorów procesów jako mikrobiwory i drapieżniki żerujące na mikrofaunie. Skoczogonki stanowią pokarm wielu różnych bezkręgowców zasiedlających powierzchnię gleby i glebę, takich jak roztocza, pareczniki, pająki, biegaczowate i kusakowate. Skoczogonki przyczyniają się do procesów rozkładu w glebach kwaśnych, w których mogą być najważniejszym bezkręgowcem żyjącym w glebie, poza wazonkowcami, ponieważ dżdżownice i dwuparce zwykle nie występują w takich glebach.

4. Gatunek *F. fimetaria* występuje na całym świecie i powszechnie zamieszkuje kilka rodzajów gleb, począwszy od gleb piaszczystych po gliniaste oraz od gleb mułowych po gleby próchnicowe typu mor. Skoczogonki należące do tego gatunku nie posiadają oczu i są bezbarwne. Ich obecność odnotowano w glebach uprawnych w całej Europie (6). Gatunek ten jest wszystkożerny, a jego pokarm obejmuje strzępki grzybni, bakterie, pierwotniaki i detrytus. Istnieje związek między żerowaniem tego gatunku a infekcjami roślin grzybami chorobotwórczymi (7) oraz może on mieć wpływ na mikoryzę, jak to ma miejsce w przypadku *F. candida*. Podobnie jak większość gatunków skoczogonków, *F.candida* rozmnaża się płciowo i do zapłodnienia wymaga stałej obecności samców.

5. *F. candida* również występuje na całym świecie. Chociaż nie występuje powszechnie w większości naturalnych gleb, często licznie występuje w miejscach bogatych w próchnicę. Skoczogonki należące do tego gatunku nie posiadają oczu i są bezbarwne. Posiadają dobrze rozwinięte widełki skokowe (organ służący do skakania), szybko się przemieszczają, biegając i bez trudu skacząc, jeżeli poczują zagrożenie. Ekologiczna rola *F. candida* jest podobna do roli *F. fimetaria*, ale jego siedlisko stanowią gleby o bardziej organicznym charakterze. Rozmnaża się za pomocą partenogenezy. Samce występują w liczbie mniejszej niż jeden na tysiąc.

ZASADA BADANIA

6. Synchroniczne dorosłe (*F. fimetaria*) lub młode (*F. candida*) skoczogonki są poddawane działaniu badanej substancji chemicznej w określonym zakresie stężeń domieszanej do zmodyfikowanej sztucznej gleby (8) z wykorzystaniem 5 % zawartości związków organicznych (lub gleby alternatywnej). Scenariusz badania można podzielić na dwa etapy:

   — badanie służące wyznaczeniu zakresu stężeń, w przypadku gdy brakuje dostatecznych informacji dotyczących toksyczności, w którym śmiertelność i rozmnażanie stanowią główne punkty końcowe oceniane po 2

▼M6

tygodniach w odniesieniu do *F. fimetaria* i po 3 tygodniach w odniesieniu do *F. candida*;

— ostateczne badanie rozrodczości, w którym ocenie podlega całkowita liczba młodych osobników wyprodukowanych przez zwierzęta rodzicielskie oraz przeżycie zwierząt rodzicielskich. Czas trwania badania ostatecznego wynosi 3 tygodnie w odniesieniu do *F. fimetaria* lub 4 tygodnie w odniesieniu do *F. candida*.

Toksyczne oddziaływanie badanych substancji chemicznych na śmiertelność i zdolność rozrodczą osobników dorosłych wyrażono jako LC_x i EC_x, dopasowując dane do odpowiedniego modelu za pomocą regresji nieliniowej w celu oszacowania stężenia, które mogłoby spowodować x % śmiertelności lub ograniczenie zdolności rozrodczej, odpowiednio, lub alternatywnie jako wartość NOEC/LOEC (9).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

7. W miarę możliwości należy znać właściwości fizyczne, rozpuszczalność w wodzie, log K_{ow}, współczynnik podziału gleba/woda oraz prężność par badanej substancji chemicznej. Pożądane są dodatkowe informacje na temat losów badanej substancji chemicznej w glebie, takie jak wskaźniki fotolizy i hydrolizy i rozkład biotyczny. Należy udokumentować tożsamość chemiczną badanej substancji chemicznej zgodnie z nomenklaturą IUPAC, numerem CAS, partią, serią, wzorem strukturalnym i stopniem czystości, jeżeli dane te są dostępne.

8. Niniejszą metodę badawczą można stosować w odniesieniu do substancji chemicznych rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych w wodzie. Sposób podawania badanej substancji chemicznej będzie się jednak odpowiednio różnił. Metoda badawcza nie ma zastosowania do lotnych substancji chemicznych, np. substancji chemicznych, w odniesieniu do których stała Henry'ego lub współczynnik podziału powietrze/woda są większe niż jeden, lub substancji chemicznych, w odniesieniu do których prężność par przekracza 0,0133 Pa w temperaturze 25 °C.

WAŻNOŚĆ BADANIA

9. Aby wynik badania był ważny, powinny być spełnione następujące kryteria dotyczące prób kontrolnych niepoddanych działaniu substancji:

— średnia śmiertelność osobników dorosłych na koniec badania nie powinna przekraczać 20 %;

— średnia liczba osobników młodych w każdym naczyniu na koniec badania powinna wynosić co najmniej 100;

— współczynnik zmienności obliczony w odniesieniu do liczby osobników młodych powinien być niższy niż 30 % na koniec ostatecznego badania.

CHEMICZNA SUBSTANCJA ODNIESIENIA

10. Chemiczną substancję odniesienia należy badać przy stężeniu EC_{50} w odniesieniu do wybranego rodzaju gleby użytej do badań, w równych odstępach czasu albo ewentualnie w trakcie każdego badania, w celu sprawdzenia, czy reakcja organizmów użytych do badania w systemie badawczym mieści się w normie. Odpowiednią chemiczną substancją odniesienia jest kwas borowy, który przy zawartości około 100 mg/kg suchej masy gleby powinien ograniczyć rozrodczość do 50 % (10) (11) w odniesieniu do obu gatunków.

OPIS BADANIA

Naczynia i sprzęt użyte do badań

11. Odpowiednimi naczyniami badawczymi są pojemniki mogące pomieścić 30 g wilgotnej gleby. Pojemnik powinien być wykonany ze szkła lub obojętnego tworzywa sztucznego (nietoksycznego). Jeżeli narażenie na działanie substancji chemicznej ulega zmniejszeniu z powodu sorpcji, należy jednak unikać stosowania pojemników z tworzywa sztucznego. Przekrój naczynia

▼M6

badawczego powinien mieć powierzchnię, która umożliwia uzyskanie w naczyniu do badań rzeczywistej warstwy gleby o grubości 2–4 cm. Naczynia powinny mieć pokrywki (np. szklane lub z polietylenu), które mają ograniczyć parowanie wody, jednocześnie umożliwiając wymianę gazu między glebą a atmosferą. Pojemnik powinien być przynajmniej częściowo przezroczysty, aby zapewnić przepuszczalność światła.

12. Wymagane jest standardowe wyposażenie laboratoryjne, obejmujące w szczególności:

— suszarkę szafkową;

— mikroskop stereoskopowy;

— pehametr i luksomierz;

— odpowiednie dokładne wagi;

— odpowiedni sprzęt do regulacji temperatury;

— odpowiedni sprzęt do regulacji wilgotności powietrza (nie jest konieczny, jeżeli naczynia narażone na działanie substancji są przykryte pokrywkami);

— inkubator lub małe pomieszczenie z regulacją temperatury;

— szczypczyki lub urządzenie o małej sile zasysania powietrza.

Przygotowanie gleby do badania

13. Stosuje się zmodyfikowaną sztuczną glebę (8) o zawartości związków organicznych wynoszącej 5 %. Można ewentualnie wykorzystać naturalną glebę, ponieważ sztuczna gleba nie przypomina naturalnych gleb. Zalecany skład sztucznej gleby jest następujący (w oparciu o masy suche, suszone do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C):

— 5 % torfu sfagnowego, suszonego na powietrzu i drobno zmielonego (dopuszczalna wielkość cząstek 2 ± 1 mm);

— 20 % glinki kaolinowej (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);

— około 74 % przemysłowego piasku suszonego na powietrzu (w zależności od potrzebnej ilości $CaCO_3$), głównie drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek ma wymiary 50–200 mikronów. Dokładna ilość piasku zależy od zawartości $CaCO_3$ (zob. poniżej), razem powinny stanowić 75 %;

— 1,0 % węglanu wapnia (sproszkowany $CaCO_3$ do analizy), aby otrzymać pH 6,0 ± 0,5; ilość dodawanego węglanu wapnia może zależeć przede wszystkim od jakości/charakteru torfu (zob. uwaga 1).

Uwaga 1: Ilość potrzebnego $CaCO_3$ będzie zależna od składników podłoża gleby i należy ją oznaczyć, dokonując bezpośrednio przed badaniem pomiaru pH podpróbek wilgotnej gleby poddanej wstępnej inkubacji.

Uwaga 2: Zaleca się dokonanie pomiaru pH i opcjonalnie wskaźnika C/N, pojemności wymiany kationów (PWK) oraz zawartości związków organicznych gleby, aby umożliwić normalizację na późniejszym etapie oraz aby lepiej zinterpretować wyniki.

Uwaga 3: W miarę potrzeby, np. do celów związanych z konkretnymi badaniami, naturalne gleby z niezanieczyszczonych obszarów mogą również służyć za podłoże do badań lub hodowli. Jeżeli jednak używa się gleby naturalnej, to nie powinna być ona zanieczyszczona i należy określić co najmniej jej pochodzenie (miejsce pobrania), pH, teksturę (rozkład wielkości cząstek), pojemność wymiany kationów (PWK) oraz zawartość związków organicznych. W przypadku naturalnej gleby zaleca się, przed jej wykorzystaniem do badania ostatecznego, wykazać jej przydatność do badań i stosowność w odniesieniu do spełnienia kryteriów ważności.

▼M6

14. Suche składniki gleby dokładnie miesza się (np. w dużym mieszalniku laboratoryjnym). Maksymalną pojemność wodną sztucznej gleby określa się zgodnie z procedurami opisanymi w dodatku 5. Zawartość wilgoci w badanej próbce gleby powinna być zoptymalizowana w celu uzyskania luźnej, porowatej struktury gleby umożliwiającej skoczogonkom wejście w pory. Zwykle wynosi ona 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej.

15. Na 2–7 dni przed rozpoczęciem badania suchą sztuczną glebę nawilża się wstępnie dodając odpowiednią ilość wody dejonizowanej w celu uzyskania około połowy końcowej zawartości wody dla zrównoważenia/ustabilizowania kwasowości. W celu określenia pH stosuje się mieszaninę gleby i 1 M roztworu chlorku potasu (KCl) lub 0,01 M roztworu chlorku wapnia ($CaCl_2$) w stosunku 1:5 (zgodnie z dodatkiem 6). Jeżeli kwasowość gleby przekracza wymagany zakres, można ją dostosować, dodając odpowiednią ilość $CaCO_3$. Jeżeli gleba jest zbyt alkaliczna, można to skorygować, dodając kwasu nieorganicznego nieszkodliwego dla skoczogonków.

16. Wstępnie nawilżoną glebę dzieli się na części odpowiadające liczbie badanych stężeń (i, w stosownych przypadkach, chemicznej substancji odniesienia) oraz prób kontrolnych zastosowanych w badaniu. Dodaje się badane substancje chemiczne i reguluje się zawartość wody, zgodnie z pkt 24.

Wybór i przygotowanie zwierząt użytych do badania

17. Zalecanym gatunkiem jest partenogeniczny *F. candida*, ponieważ w porównaniach międzylaboratoryjnych metody badawczej (11) gatunek ten spełniał kryteria ważności dla przeżycia częściej niż *F. fimetaria*. W przypadku wykorzystania alternatywnego gatunku powinien on spełniać kryteria ważności określone w pkt 9. Na początku badania zwierzęta powinny być dobrze odżywione, wiek *F.* fimetaria powinien wynosić 23–26 dni, a wiek *F. candida* 9–12 dni. W każdej kontrpróbie liczba *F. fimetaria* powinna wynosić 10 samców i 10 samic, a w przypadku *F. candida* należy użyć 10 samic (zob. dodatek 2 i 3). Synchroniczne zwierzęta są losowo wybierane z naczynia i sprawdzane pod kątem stanu zdrowia i stanu fizycznego dla każdej partii dodanej do kontrpróby. Każdą grupę 10/20 osobników dodaje się do losowo wybranego pojemnika badawczego; należy wybrać duże samice *F. fimetaria* w celu odróżnienia ich od samców *F. fimetaria*.

Przygotowywanie badanych stężeń

18. Można wykorzystać cztery metody dodawania badanej substancji chemicznej: 1) wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą z wykorzystaniem wody jako nośnika, 2) wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą z wykorzystaniem rozpuszczalnika organicznego jako nośnika, 3) wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą z wykorzystaniem piasku jako nośnika lub 4) pokrycie powierzchni gleby badaną substancją chemiczną. Wybór odpowiedniej metody zależy od właściwości substancji chemicznej oraz od celu badania. Zwykle zaleca się wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą. Mogą być jednak wymagane procedury dodawania, które są zgodne z praktycznym wykorzystaniem badanej substancji chemicznej (np. opryskiwanie płynną postacią lub zastosowanie specjalnych postaci pestycydów, takich jak granulki lub zaprawy do nasion). Gleba poddawana jest działaniu substancji chemicznej przed dodaniem skoczogonków, chyba że badaną substancją chemiczną pokrywa się powierzchnię gleby, wówczas wpuszczenie skoczogonków do gleby powinno być dozwolone.

Badana substancja chemiczna rozpuszczalna w wodzie

19. Roztwór badanej substancji chemicznej przygotowuje się w wodzie dejonizowanej w ilości wystarczającej do wszystkich kontrprób w ramach jednego badanego stężenia. Przed wprowadzeniem do naczynia badawczego każdy roztwór badanej substancji chemicznej jest dokładnie mieszany z jedną partią wstępnie nawilżonej gleby.

Badana substancja chemiczna nierozpuszczalna w wodzie

20. W przypadku substancji chemicznych nierozpuszczalnych w wodzie, ale rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych, badana substancja chemiczna może być rozpuszczona w jak najmniejszej objętości odpowiedniego rozpuszczalnika (np. w acetonie); należy zapewnić właściwe wymieszanie substancji chemicznej z glebą oraz wymieszanie z wymaganą częścią piasku kwarcowego. Należy stosować jedynie lotne rozpuszczalniki. Jeżeli

▼M6

stosuje się rozpuszczalnik organiczny, wszystkie badane stężenia i ujemne próby kontrolne z dodatkowym rozpuszczalnikiem powinny zawierać tę samą minimalną ilość rozpuszczalnika. Pojemniki, w których zastosowano rozpuszczalniki, należy pozostawić bez przykrycia na pewien okres czasu, aby umożliwić odparowanie rozpuszczalnika związanego z podaniem badanej substancji chemicznej, zapewniając przez ten czas brak rozproszenia toksycznej substancji chemicznej.

Badana substancja chemiczna słabo rozpuszczalna w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych

21. W przypadku substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie oraz w rozpuszczalnikach organicznych piasek kwarcowy, który powinien stanowić część całego piasku dodawanego do gleby, miesza się z badaną substancją chemiczną w celu otrzymania pożądanego badanego stężenia. Taką mieszaninę piasku kwarcowego i badanej substancji chemicznej dodaje się do uprzednio zwilżonej gleby i dokładnie miesza po dodaniu odpowiedniej ilości dejonizowanej wody w celu otrzymania wymaganej zawartości wilgoci. Otrzymaną mieszaninę przekłada się do naczyń badawczych. Procedurę tę powtarza się dla każdego badanego stężenia, a także przygotowuje się odpowiednią próbę kontrolną.

Pokrycie powierzchni gleby badaną substancją chemiczną

22. Jeżeli substancja chemiczna jest pestycydem, właściwe może być zastosowanie jej na powierzchnię gleby przez rozpylenie. Glebę poddaje się działaniu substancji chemicznej po wprowadzeniu do gleby skoczogonków. Najpierw napełnia się pojemniki badawcze nawilżonym podłożem glebowym i wprowadza zwierzęta, a następnie waży się pojemnik badawczy. Aby uniknąć bezpośredniego narażenia zwierząt na na badaną substancją chemiczną przez kontakt bezpośredni, dodaje się ją co najmniej pół godziny przed wprowadzeniem skoczogonków. Badaną substancję chemiczną należy rozprowadzić na powierzchni gleby jak najbardziej równomiernie, korzystając z odpowiednich laboratoryjnych urządzeń rozpylających symulujących opryski w terenie. Wahania temperatury przy rozprowadzaniu substancji nie powinny przekraczać ± 2 °C, a w przypadku roztworów wodnych, emulsji lub zawiesin dawka podawanej wody powinna być zgodna z zaleceniami dotyczącymi oceny ryzyka. Dawkę należy zweryfikować za pomocą odpowiedniej techniki kalibracji. Szczególne postacie, takie jak granulki lub zaprawy do nasion, można stosować w sposób zgodny z rolniczym użytkowaniem gruntów. Pokarm podaje się po rozpyleniu.

PROCEDURA

Warunki badania

23. Średnia temperatura, w której należy prowadzić badanie, powinna wynosić 20 ± 1 °C przy zakresie temperatur 20 ± 2 °C. Badanie przeprowadza się w warunkach kontrolowanych cykli światło-ciemność (najlepiej 12 godzin światła i 12 godzin ciemności) z natężeniem światła na obszarze z naczyniami badawczymi na poziomie 400–800 luksów.

24. W celu kontrolowania wilgotności gleby naczynia waży się na początku, w trakcie i na koniec badania. Utratę masy > 2 % uzupełnia się dodając wody dejonizowanej. Należy zauważyć, że utratę wody można ograniczyć dzięki utrzymaniu wysokiej wilgotności powietrza (> 80 %) w inkubatorze badawczym.

25. pH należy mierzyć na początku i na końcu badania ustalającego zakres stężeń i badania ostatecznego. Pomiary należy wykonać w jednej dodatkowej próbie kontrolnej i jednej dodatkowej próbie spośród próbek gleby poddanej działaniu substancji (wszystkie stężenia), przygotowanych i utrzymywanych w taki sam sposób jak hodowle badane, ale bez wprowadzania skoczogonków.

Procedura badania i pomiary

26. W odniesieniu do każdego badanego stężenia w naczyniu badawczym umieszcza się ilość badanej gleby odpowiadającą 30 g mokrej masy. Przygotowuje się również próby kontrolne z wodą niezawierające badanej substancji

▼M6

chemicznej. Jeżeli zastosowano nośnik w celu dodania badanej substancji chemicznej, oprócz serii prób badanych należy przygotować jedną serię prób kontrolnych zawierających sam nośnik. Stężenie rozpuszczalnika lub środka dyspergującego powinno być takie samo jak stężenie zastosowane w naczyniach badawczych zawierających badaną substancję chemiczną.

27. Pojedyncze skoczogonki przenosi się ostrożnie do każdego z naczyń badawczych (przydziela się je losowo do naczyń przeznaczonych do badania) i umieszcza na powierzchni gleby. W celu sprawnego przeniesienia zwierząt można wykorzystać urządzenie o małej sile zasysania powietrza. Liczba kontrprób w odniesieniu do badanych stężeń oraz w odniesieniu do prób kontrolnych zależy od zastosowanego projektu badania. Naczynia badawcze rozmieszcza się losowo w inkubatorze do badań i losowo zmienia ich położenie raz na tydzień.

28. W przypadku dwudziestu badanych dorosłych osobników *F. fimetaria* w jednym naczyniu badawczym należy umieścić 10 samców i 10 samic w wieku 23–26 dni. W 21. dniu skoczogonki wyjmuje się z gleby i liczy. W odniesieniu do *F. fimetaria* w zsynchronizowanej partii zwierząt wykorzystanych w badaniu płeć rozróżnia się na podstawie rozmiaru. Samice są wyraźnie większe od samców (zob. dodatek 3).

29. W przypadku badanych osobników *F. candida* w jednym naczyniu badawczym należy umieścić dziesięć 9–12-dniowych młodych osobników. W 28. dniu skoczogonki wyjmuje się z gleby i liczy.

30. Jako odpowiednie źródło pokarmu na początku badania i po upływie około dwóch tygodni do każdego pojemnika dodaje się wystarczającą ilość, np. 2–10 mg, granulowanych suszonych drożdży piekarskich, dostępnych w handlu do użytku domowego.

31. Na końcu badania określa się śmiertelność i rozrodczość. Po upływie trzech (*F. fimetaria*) lub czterech tygodni (*F. candida*) wyjmuje się skoczogonki z badanej gleby (zob. dodatek 4) i liczy (12). Skoczogonka uznaje się za martwego, jeżeli nie na go wśród skoczogonków wyjętych z gleby. Metodę wyjmowania i liczenia należy zwalidować. Walidacja obejmuje skuteczność wyjmowania osobników młodych przekraczającą 95 % np. dzięki dodaniu znanej liczby osobników do gleby.

32. Praktyczne podsumowanie i harmonogram dotyczący procedury badania znajdują się w dodatku 2.

Projekt badania

Badanie ustalające zakres stężeń

33. W stosownych przypadkach badanie ustalające zakres stężeń przeprowadza się np. stosując pięć stężeń badanej substancji chemicznej 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg suchej masy gleby oraz dwie kontrpróby w odniesieniu do każdego zabiegu i próbę kontrolną. Dodatkowe informacje (dotyczące śmiertelności i rozrodczości skoczogonków) uzyskane na podstawie badań podobnych substancji chemicznych lub literatury mogą okazać się przydatne również przy podejmowaniu decyzji dotyczącej zakresu stężeń, jakie mają zostać użyte w badaniu służącym wyznaczaniu zakresu stężeń.

34. Czas trwania badania ustalającego zakres stężeń wynosi dwa tygodnie w przypadku *F. fimetaria* i 3 tygodnie w przypadku *F. candida* w celu zapewnienia jednego wylęgu osobników młodych. Na końcu badania określa się śmiertelność i rozrodczość skoczogonków. Należy odnotować liczbę osobników dorosłych i występowanie osobników młodych.

Badanie ostateczne

35. W celu wyznaczenia EC_x (np. EC_{10}, EC_{50}) należy poddać badaniom dwanaście stężeń. Zaleca się wykonanie co najmniej dwóch kontrprób w odniesieniu do każdego zabiegu z badanym stężeniem oraz sześciu kontrprób kontrolnych. Współczynnik rozstawienia stężeń może różnić się w zależności od schematu dawka-odpowiedź.

▼M6

36. W celu wyznaczenia NOEC/LOEC należy zbadać co najmniej pięć stężeń uporządkowanych w szeregu geometrycznym. Zalecane są cztery kontrpróby w odniesieniu do każdego zabiegu z badanym stężeniem i osiem prób kontrolnych. Wielkości stężeń powinny być rozstawione ze współczynnikiem nieprzekraczającym 1,8.

37. Łączone podejście umożliwia wyznaczenie zarówno NOEC/LOEC, jak i ECx. W odniesieniu do łączonego podejścia należy użyć w zabiegach osiem stężeń w szeregu geometrycznym. Zaleca się wykonie czterech kontrprób w odniesieniu do każdego zabiegu i ośmiu prób kontrolnych. Wielkości stężeń powinny być rozstawione ze współczynnikiem nieprzekraczającym 1,8.

38. Jeżeli w badaniu ustalającym zakres stężeń w przypadku najwyższego stężenia (tj. 1 000 mg/kg) nie zaobserwowano żadnych zmian, jako badanie graniczne można przeprowadzić badanie rozrodczości, stosując badane stężenie 1 000 mg/kg i próbę kontrolną. Badanie graniczne stworzy możliwość wykazania, że nie istnieje żaden statystycznie istotny wpływ przy stężeniu granicznym. Należy zastosować osiem kontrprób w odniesieniu do badanej gleby i próby kontrolnej.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

39. Zdolność rozrodcza stanowi główny punkt końcowy (np. liczba wyprodukowanych młodych osobników w przeliczeniu na naczynie badawcze). W ramach analizy statystycznej, np. procedur ANOVA, porównuje się zabiegi za pomocą testu t-Studenta, testu Dunnetta lub testu Williamsa. 95 % przedziały ufności oblicza się w odniesieniu do poszczególnych średnich wartości zabiegów.

40. Liczba żywych osobników dorosłych w próbach kontrolnych, których nie poddano działaniu substancji, stanowi główne kryterium ważności i należy ją udokumentować. Podobnie jak w przypadku badania ustalającego zakres stężeń w sprawozdaniu końcowym należy również podać wszystkie pozostałe objawy szkodliwości.

LC_x oraz EC_x

41. Wartości EC_x, w tym powiązane z nimi górne i dolne 95 % granice ufności w odniesieniu do danego parametru, oblicza się stosując odpowiednie metody statystyczne (np. funkcja logistyczna lub Weibulla, metoda Spearmana-Karbera lub zwykła interpolacja). EC_x otrzymuje się przez wstawienie wartości odpowiadającej x % średniej wartości próby kontrolnej do utworzonego równania. Aby obliczyć EC_{50} lub dowolną inną wartość EC_x, należy zastosować analizę regresji w odniesieniu do kompletnego zestawu danych. LC_{50} zwykle oszacowuje się poprzez analizę probitową lub podobną, w której uwzględnia się dane dotyczące śmiertelności w rozkładzie dwumianowym.

NOEC/LOEC

42. Jeżeli analiza statystyczna ma na celu wyznaczenie NOEC/LOEC, niezbędne są dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyń (poszczególne naczynia uznaje się za kontrpróby). Odpowiednie metody statystyczne należy stosować zgodnie z dokumentem OECD nr 54 „Aktualne podejście do statystycznej analizy danych ekotoksyczności: wytyczne stosowania” (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (9). Niekorzystny wpływ badanej substancji chemicznej w porównaniu z próbą kontrolną oblicza się na ogół, stosując test jednostronny dla $p \leq 0,05$.

43. Rozkład normalny i jednorodność wariancji można zbadać za pomocą odpowiedniego testu statystycznego, np. za pomocą testu Shapiro-Wilka i testu Levene'a, odpowiednio ($p \leq 0,05$). Można wykonać jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) i kolejne testy wielokrotnego porównywania. Testy wielokrotnego porównywania (np. test Dunnetta) lub regresyjne testy trendu

▼M6

(test Williamsa) mogą być stosowane w celu obliczenia, czy istnieje znacząca różnica ($p \leq 0,05$) między próbami kontrolnymi a różnymi stężeniami badanej substancji chemicznej (wybór zalecanego testu zgodnie z dokumentem OECD nr 54 (9)). W przeciwnym razie NOEC i LOEC można określić za pomocą metod nieparametrycznych (np. za pomocą testu U-Bonferroniego zgodnie z testem trendu Holma lub Jonckheere'a-Terpstry).

Badanie graniczne

44. Jeżeli przeprowadzono badanie graniczne (porównanie próby kontrolnej z jedną tylko próbą poddaną zabiegowi) i spełniono warunki wstępne dotyczące parametrycznych procedur badania (normalność, jednorodność), odpowiedzi metryczne można ocenić za pomocą testu t-Studenta. Jeżeli warunki te nie są spełnione, można zastosować test t-Studenta (test t-Welcha) dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, taki jak test U Manna-Whitneya.

45. Aby określić znaczące różnice między próbami kontrolnymi (próbą kontrolą i próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem), kontrpróby każdej próby kontrolnej mogą zostać poddane badaniu zgodnie z opisem dotyczącym badania granicznego. Jeżeli w wyniku tych badań nie zostaną wykryte znaczące różnice, wszystkie próby kontrolne i kontrpróby kontrolne z rozpuszczalnikiem mogą być połączone. W przeciwnym wypadku wszystkie zabiegi należy porównać z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem.

Sprawozdanie z badania

46. Sprawozdanie z badania powinno zawierać co najmniej następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— nazwa badanej substancji chemicznej, partia, seria i numer CAS, stopień czystości;

— właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej (np. log K_{ow}, rozpuszczalność w wodzie, prężność par, stała Henry'ego (H) i w miarę możliwości informacje o losach badanej substancji chemicznej w glebie), o ile są dostępne;

— należy określić postać użytkową badanej substancji chemicznej i dodatki, jeżeli badana substancja chemiczna nie jest chemicznie czysta;

Organizmy użyte do badań

— identyfikacja gatunku i dostawcy organizmów użytych do badania, opis warunków hodowli i przedział wiekowy organizmów użytych do badania;

Warunki badania

— opis planu doświadczalnego i procedury doświadczalnej;

— szczegóły dotyczące przygotowania gleby do badania; szczegółowa specyfikacja, jeżeli używa się naturalnej gleby (pochodzenie, historia, rozkład wielkości cząstek, pH, zawartość związków organicznych);

— pojemność wodna gleby;

— opis techniki stosowanej do wprowadzenia badanej substancji chemicznej do gleby;

— *Warunki badania* natężenie światła, czas trwania cykli światło-ciemność, temperatura;

— opis schematu żywienia, rodzaj i ilość pokarmu używanego w badaniu, terminy karmienia;

— pH i zawartość wody w glebie na początku i na końcu badania (próba kontrolna i każda próba poddana zabiegowi);

— szczegółowy opis metody wyjmowania i skuteczności wyjmowania;

▼**M6**

Wyniki badania

— liczba osobników młodych oznaczonych w naczyniu badawczym na końcu badania;

— liczba osobników dorosłych i ich śmiertelność (%) w każdym naczyniu badawczym na końcu badania;

— opis wyraźnych objawów fizjologicznych lub patologicznych lub widocznych zmian w zachowaniu;

— wyniki otrzymane z wykorzystaniem badanej substancji chemicznej odniesienia;

— wartości NOEC/LOEC, LC_x w odniesieniu do śmiertelności oraz EC_x w odniesieniu do rozrodczości (głównie LC_{50}, LC_{10}, EC_{50} i EC_{10}) wraz z 95 % przedziałami ufności. Wykres dopasowanego modelu użytego do obliczania, równanie jego funkcji i jego parametry (zob. (9));

— wszystkie informacje i obserwacje pomocne w interpretacji wyników;

— moc rzeczywistego testu, jeżeli wykonano testowanie hipotez (9);

— odchylenia od procedur opisanych w niniejszej metodzie badawczej oraz wszelkie nietypowe zdarzenia, jakie miały miejsce podczas badania;

— ważność badania;

— w odniesieniu do NOEC, w przypadku oszacowania, minimalne wykrywalne różnice.

BIBLIOGRAFIA

(1) Wiles J.A. i Krogh P.H. (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. W: Handbook of soil invertebrate toxicity tests (red. H Løkke i CAM Van Gestel), s. 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. Nr 11267. Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna, Genewa.

(3) Burges A. i Raw F. (red.) (1967) Soil Biology, Academic Press. Londyn.

(4) Petersen H. i 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. 330 s. (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. W: New trends in soil Biology (Lebrun Ph., André H.M., De Medts A., Grégoire-Wibo, Wauthy G. (red.), Obrady VI międzynarodowego kolokwium w sprawie zoologii gleby, Louvain-la-neuve (Belgia), 30 sierpnia–2 września 1982 r., I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, s. 261–268.

(8) Rozdział C.36 niniejszego załącznika, Badanie rozrodczości drapieżnych roztoczy (*Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*) w glebie.

(9) OECD (2006) Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paryż.

(10) Scott-Fordsmand J.J. i Krogh P.H. (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Projekt ekologiczny nr 986, Miljøstyrelsen, s. 61, Duńskie Ministerstwo Środowiska.

▼**M6**

(11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Duńska Agencja Ochrony Środowiska, projekt ekologiczny nr 1256, s. 66.

(12) Krogh PH., Johansen K. i 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. W: Soil Zoology (Kevan D.K. McE., red.). Butterworths, Londyn, s. 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

Dodatek 1

Definicje

Następujące definicje mają zastosowanie do niniejszej metody badawczej (w tym badaniu wszystkie stężenia powodujące zmiany wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby):

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian) oznacza stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym nie obserwuje się żadnych szkodliwych zmian. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające NOEC nie ma statystycznie istotnego wpływu ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia przy porównaniu z próbą kontrolną.

LOEC (najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany) oznacza najniższe stężenie badanej substancji chemicznej mające statystycznie istotny wpływ ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną.

ECx (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływ na organizmy użyte do badań w danym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną. Na przykład EC_{50} jest stężeniem, które według szacunków ma wpływ na punkt końcowy badania u 50 % narażonej populacji w określonym okresie narażenia.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

▼M6

Dodatek 2

Główne działania i harmonogram przeprowadzania badania skoczogonków

Etapy badania mozna podsumować następująco:

Czas (dni)	Działanie
od – 23 do – 26	Przygotować synchroniczną hodowlę *F. fimetaria*.
– 14	Przygotować sztuczną glebę (mieszając suche składniki). Sprawdzić pH sztucznej gleby i odpowiednio je skorygować. Dokonać pomiaru maksymalnej pojemności wodnej gleby.
od – 9 do – 12	Przygotować synchroniczną hodowlę *F. candida*.
od – 2 do – 7	Wstępnie nawilżyć glebę.
– 1	Podzielić młode osobniki na partie. Przygotować roztwory podstawowe i dodać badaną substancję chemiczną, jeżeli wymagany jest rozpuszczalnik.
0	Przygotować roztwory podstawowe i dodać badaną substancję chemiczną, jeżeli ma ona postać stałą, jest rozpuszczalna w wodzie lub nanoszona na powierzchnię. Dokonać pomiaru pH gleby i zważyć pojemniki. Dodać pokarm. Wprowadzić skoczogonki.
14	Badanie ustalające zakres stężeń *F. fimetaria*: zakończyć badanie, wyjąć zwierzęta, dokonać pomiaru pH gleby i utraty wody (masa). Badanie ostateczne: dokonać pomiaru zawartości wilgoci, uzupełnić wodę i dodać 2–10 mg drożdży.
21	Badanie ostateczne *F. fimetaria*: zakończyć badanie, wyjąć zwierzęta, dokonać pomiaru pH gleby i utraty wody (masa). Badanie ustalające zakres stężeń *F. candida*: zakończyć badanie, wyjąć zwierzęta, dokonać pomiaru pH gleby i utraty wody (masa).
28	Badanie ostateczne *F. candida*: zakończyć badanie, wyjąć zwierzęta, dokonać pomiaru pH gleby i utraty wody (masa).

▼M6

Dodatek 3

Wytyczne dotyczące hodowli i synchronizacji *F. fimetaria* I *F. candida*

Należy sprawdzić czas i okresy czasu trwania podane w niniejszej wytycznej w odniesieniu do każdego konkretnego szczepu skoczogonków, aby dobrany moment umożliwiał dostateczną synchronizację młodych osobników. Zasadniczo częstotliwość składania jaj po przeniesieniu dorosłych osobników do świeżego podłoża oraz wylęg jaj pomagają określić odpowiedni dzień na zbiór jaj i synchronicznych młodych osobników.

Zaleca się posiadanie stałej kultury wyjściowej składającej się z np. 50 pojemników/płytek Petriego. Kulturę wyjściową utrzymywać należy w dobrych warunkach żywieniowych, karmiąc raz w tygodniu, nawadniając i usuwając stary pokarm i padłe zwierzęta. Na skutek zbyt małej liczby skoczogonków w podłożu może nastąpić zahamowanie ich rozwoju w wyniku zwiększonego wzrostu grzybów. Jeżeli kulturę wyjściową zbyt często wykorzystuje się do produkcji jaj, może ona ulec zmęczeniu. Oznakami zmęczenia są martwe dorosłe osobniki i pleśń na podłożu. Pozostałe jajeczka pochodzące z produkcji synchronicznych zwierząt mogą zostać wykorzystane do odmłodzenia hodowli.

W przypadku synchronicznej kultury *F. fimetaria* samce odróżnia się od samic głównie rozmiarem. Samce są wyraźnie mniejsze od samic i poruszają się szybciej niż samice. Prawidłowa selekcja płci wymaga pewnej wprawy i może zostać potwierdzona mikroskopową identyfikacją okolic narządów płciowych (13).

1. **Hodowla**

1.a. *Przygotowanie podłoża do hodowli*

Podłoże do hodowli składa się z gipsu modelarskiego (siarczanu wapnia) z aktywnym węglem drzewnym. Rozwiązanie to zapewnia wilgotność podłoża, przy czym węgiel pochłania gazy odlotowe i odchody (14) (15). W celu ułatwienia obserwacji skoczogonków można stosować różne postacie węgla. Na przykład sproszkowany węgiel wykorzystuje się w przypadku *F. candida* i *F. fimetaria* (co daje czarno-szary kolor gipsu modelarskiego):

Składniki podłoża:

— 20 ml węgla aktywnego

— 200 ml wody destylowanej

— 200 ml gipsu modelarskiego

albo

— 50 g sproszkowanego węgla aktywnego

— 260–300 ml wody destylowanej

— 400 g gipsu modelarskiego.

Przed użyciem należy pozostawić mieszaninę podłoża do ustalenia.

1.b. *Hodowla*

Skoczogonki są przechowywane w pojemnikach, takich jak płytki Petriego (90 mm × 13 mm), których dno pokryte jest warstwą podłoża z gipsu / węgla o grubości 0,5 cm. Hoduje się je w temperaturze 20 ± 1 °C, przy cyklu światła/ciemności wynoszącym 12/12 godzin (400–800 luksów). Pojemniki należy przez cały czas zwilżać zapewniając wilgotność względną powietrza wewnątrz pojemników na poziomie 100 %. Można to zapewnić dzięki obecności niezwiązanej wody w porowatym gipsie, nie dopuszczając

▼M6

jednak do powstania warstwy wody na powierzchni gipsu. Utracie wody można zapobiec poprzez zapewnienie wilgotnego powietrza otoczenia. Wszystkie martwe osobniki i pleśniejący pokarm należy usuwać z pojemników. W celu pobudzenia produkcji jajeczek konieczne jest przeniesienie dorosłych zwierząt na płytki Petriego ze świeżo przygotowanym podłożem z gipsu modelarskiego/węgla.

1.c. *Źródło pokarmu*

Zarówno w przypadku *F. candida*, jak i *F fimetaria* jako jedyne źródło pokarmu stosuje się granulowane suszone drożdże piekarskie. Świeży pokarm jest podawany raz lub dwa razy w tygodniu, aby zapobiec pleśnieniu. Umieszcza się go bezpośrednio na gipsie modelarskim w małej kupce. Masę dodawanych drożdży piekarskich należy dostosować do wielkości populacji skoczogonków, przy czym zasadniczo wystarczająca ilość to 2–15 mg.

2. **Synchronizacja**

Badanie należy przeprowadzić z wykorzystaniem synchronicznych zwierząt w celu uzyskania jednorodnych zwierząt do badania w tym samym stadium larwalnym i tej samej wielkości. Ponadto synchronizacja umożliwia rozróżnienie samców i samic gatunku *F. fimetaria* w wieku od 3 tygodni wzwyż na podstawie dymorfizmu płciowego tj. różnic wielkości. Poniższa procedura stanowi propozycję sposobu uzyskania zsynchronizowanych zwierząt (praktyczne kroki są opcjonalne).

2.a. *Synchronizacja*

— Przygotować pojemniki, których dno pokryte jest warstwą podłoża z gipsu modelarskiego/węgla o grubości 0,5 cm.

— Przenieść 150–200 dorosłych osobników gatunku *F. fimetaria* i 50–100 gatunku *F. candida* z najlepszych 15–20 pojemników kultury wyjściowej z 4–8 tygodniowym podłożem do pojemników w celu złożenia jaj i podać 15 mg drożdży piekarskich. Unikać przechowywania młodych osobników razem z dorosłymi osobnikami, ponieważ obecność młodych osobników może spowodować zahamowanie procesu składania jaj.

— Przechowywać kulturę w temperaturze 20 ± 1 °C (średnia powinna wynosić 20 °C) w cyklu światła/ciemności wynoszącym 12/12 godzin (400–800 luksów). Zapewnić świeży pokarm oraz nasycenie powietrza wodą. Brak pokarmu może doprowadzić do wypróżniania się zwierząt na jajeczka, co może skutkować rozwojem grzybów, lub do zjedzenia w akcie kanibalizmu przez *F. candida* własnych jaj. Po 10 dniach zebrać ostrożnie jajeczka igłą lub szpatułką i przenieść na „bibułę do jajeczek” (mały kawałek bibuły filtracyjnej zanurzony w mieszaninie gipsu modelarskiego/szlamu węglowego), umieszczony w naczyniu ze świeżym podłożem z gipsu/węgla. W celu przyciągnięcia młodych osobników i nakłonienia ich do opuszczenia bibuły do jaj do podłoża dodaje się kilka ziaren drożdży. Ważne jest, aby bibuła do jajeczek i podłoże były wilgotne, bowiem w przeciwnym razie jajeczka ulegną dehydratacji. Inny sposób polega na usunięciu dorosłych zwierząt z pojemników służących do synchronizacji kultury po 2–3 dniach składania przez nie jaj.

— Po trzech dniach z większości jajeczek umieszczonych na bibule wyklują się młode osobniki, a niektóre z nich będzie można znaleźć pod bibułą.

— W celu zapewnienia jednakowego wieku młodych osobników bibułę do jajeczek z niewyklutymi jajeczkami usuwa się z płytki Petriego za pomocą szczypczyków. Młode osobniki, będące teraz w wieku 0–3, dni pozostają na płytce i są karmione drożdżami piekarskimi. Niewyklute jajeczka należy wyrzucić.

— Jaja i wyklute młode osobniki hoduje się w taki sam sposób jak osobniki dorosłe. W szczególności w przypadku gatunku *F. fimetaria* podjąć należy następujące środki: zapewnić wystarczającą ilość świeżego pokarmu, usuwać zapleśniałe pożywienie, po 1 tygodniu młode osobniki należy rozdzielić na nowe płytki Petriego, pod warunkiem że zagęszczenie wynosi powyżej 200 sztuk.

▼**M6**

2.b. *Postępowanie ze skoczogonkami w momencie rozpoczęcia badania*

— *F. candida* w wieku 9–12 dni lub *F. fimetaria* w wieku 23–26 dni zbiera się np. przez zasysanie i wypuszcza do małego pojemnika z mokrym podłożem z gipsu/węgla, a ich stan fizyczny sprawdza się pod dwuokularowym mikroskopem (należy odrzucić ranne lub uszkodzone zwierzęta). Wszystkie etapy należy wykonać jednocześnie, przechowując skoczogonki w wilgotnej atmosferze, aby uniknąć stresu spowodowanego wysuszeniem, np. stosując mokre powierzchnie itp.

— Odwróć pojemnik do góry nogami i stuknąć weń w celu przerzucenia skoczogonków do gleby. Należy zneutralizować ładunki elektrostatyczne, w przeciwnym razie zwierzęta mogą po prostu unieść się w powietrze lub przylepić się do ścianki pojemnika badawczego i wyschnąć. W celu neutralizacji można wykorzystać jonizator lub mokrą szmatkę położoną pod pojemnikiem.

— Pokarm należy rozrzucić na całej powierzchni gleby, a nie położyć w postaci w jednej bryłki.

— Podczas transportu i w trakcie badania należy unikać uderzania lub innego fizycznego zakłócania spokoju w pojemnikach badawczych, ponieważ może to zwiększyć zagęszczenie gleby i utrudniać interakcje między skoczogonkami.

3. **Inne gatunki skoczogonków**

Do badania zgodnie z niniejszą metodą badawczą można wybrać inne gatunki skoczogonków, takie jak *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. Przed wykorzystaniem innych gatunków spełniony musi zostać szereg warunków wstępnych:

— należy je jednoznacznie zidentyfikować;

— należy przedstawić uzasadnienie wyboru gatunku;

— należy zapewnić włączenie biologii reprodukcyjnej w etap badania, tak aby stanowiła potencjalny cel na etapie narażenia;

— znana musi być historia życia: wiek osiągnięcia dojrzałości, długość rozwoju jaja i stadia larwalne poddawane narażeniu;

— należy zapewnić optymalne warunki dla wzrostu i reprodukcji, stosując odpowiednie podłoże badawcze i źródło pokarmu;

— zmienność powinna być odpowiednio niska, aby zapewnić precyzyjne i dokładne oszacowanie toksyczności.

▼M6

Dodatek 4

Wyjęcie i liczenie zwierząt

1. **Wyjęcie zwierząt można przeprowadzić dwoma metodami**

1.a. Pierwsza metoda: ekstraktor z kontrolowanym gradientem temperatury oparty na zasadzie działania aparatu MacFaydena (1). Ciepło wytwarzane przez element grzewczy znajdujący się w górnej części komory ekstrakcyjnej (regulowane przez termistor umieszczony na powierzchni próbki gleby). Temperatura w chłodzonym płynnym otoczeniu naczynia odbiorczego regulowana jest przez termistor umieszczony na powierzchni komory odbiorczej (umieszczonej poniżej warstwy gleby). Termistory podłączone są do programowalnej jednostki sterującej, która zwiększa temperaturę zgodnie z zaprogramowanym wcześniej harmonogramem. Zwierzęta zbierane są w chłodzonej komorze odbiorczej (2 °C) z dolną warstwą wykonaną z gipsu modelarskiego/węgla. Wyjmowanie rozpoczyna się w temperaturze 25 °C, a następnie temperatura jest automatycznie podwyższana o 5 °C co 12 godzin i całkowity czas trwania wyjmowania wynosi 48 godzin. Po 12 godzinach w temperaturze 40 °C wyjmowanie zwierząt zostaje zakończone.

1.b. Druga metoda: po eksperymentalnym okresie inkubacji liczbę obecnych młodych skoczogonków ocenia się za pomocą flotacji. W tym celu badanie wykonuje się w naczyniach o objętości około 250 ml. W końcowej fazie badania dodaje się około 200 ml wody destylowanej. Glebę łagodnie rozgarnia się za pomocą delikatnego pędzla, aby umożliwić skoczogonkom wypłynięcie na powierzchnię wody. Do wody dodać można trochę czarnego barwnika fotograficznego Kentmere w ilości około 0,5 ml, aby ułatwić liczenie przez zwiększenie kontrastu między wodą i białymi skoczogonkami. Barwnik nie jest toksyczny dla skoczogonków.

2. **Liczenie:**

Zwierzęta można liczyć wizualnie albo za pomocą mikroskopu świetlnego, stosując siatkę umieszczoną nad naczyniem, w którym pływają osobniki, albo fotografując powierzchnię każdego naczynia, a następnie licząc skoczogonki na powiększonych wydrukach lub na slajdach wyświetlanych z rzutnika. Obliczenia można również przeprowadzić, wykorzystując cyfrowe techniki przetwarzania obrazu (12). Wszystkie techniki powinny być zwalidowane.

▼**M6**

Dodatek 5

Określenie maksymalnej pojemności wodnej gleby

Wykazano, że do określania maksymalnej pojemności wodnej gleby (WHC) odpowiednia jest następująca metoda. Została ona opisana w załączniku C normy ISO DIS 11268-2 (Jakość gleby - Wpływ zanieczyszczeń na dżdżownice (*Eisenia fetida*). Część 2: Określenie wpływu na reprodukcję).

Pobrać określoną ilość (np. 5 g) badanej gleby z podłoża, wykorzystując w tym celu odpowiedni przyrząd do pobierania próbek (wybierak ślimakowy itd.) Przykryć dno wybieraka mokrym kawałkiem bibuły filtracyjnej, a następnie umieścić wybierak na stelażu w łaźni wodnej. Wybierak należy stopniowo zanurzać aż do momentu, gdy poziom wody znajdzie się powyżej powierzchni gleby. Następnie należy zostawić go w wodzie na około trzy godziny. Ponieważ nie cała woda wchłonięta przez kapilary w glebie może zostać zatrzymana, należy umieścić wybierak na podłożu z wilgotnego drobno zmielonego piasku kwarcowego umieszczonego w przykrytym naczyniu (aby zapobiec wysychaniu) na dwie godziny w celu odsączenia próbki gleby. Próbkę należy następnie zważyć, wysuszyć do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C. Pojemność wodną gleby (WHC) należy obliczać w następujący sposób:

$$\text{WHC (w \% suchej masy)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

gdzie:

S = podłoże nasycone wodą + masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej

T = tara (masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej)

D = sucha masa podłoża

▼**M6**

Dodatek 6

Określenie pH gleby

Podana poniżej metoda określania pH gleby opiera się na opisie zawartym w normie ISO DIS 10390: Jakość gleby – Określenie pH.

Określoną ilość gleby suszy się w temperaturze pokojowej przez co najmniej 12 godzin. Następnie sporządza się zawiesinę gleby (zawierającą co najmniej 5 gramów gleby) w 1 M roztworze czystego chlorku potasu do analiz (KCl) lub 0,01 M roztworze czystego chlorku wapnia do analizy ($CaCl_2$) o objętości pięciokrotnie większej od objętości gleby. Otrzymaną zawiesinę wytrząsa się przez pięć minut, a następnie odstawia do osadzenia się na co najmniej 2 godziny, ale nie na dłużej niż 24 godziny. W fazie ciekłej pH mierzy się za pomocą pehametru, który jest kalibrowany przed każdym pomiarem przy użyciu odpowiedniego szeregu roztworów buforowych (np. pH 4,0 i 7,0).

▼M6

C.40. **BADANIE TOKSYCZNOŚCI W UKŁADZIE OSAD-WODA W CYKLU ŻYCIA OCHOTKOWATYCH Z WYKORZYSTANIEM WZBOGACONEJ WODY LUB WZBOGACONEGO OSADU**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 233 (2010 r.) w sprawie badań. Metoda ma na celu ocenę skutków trwającego przez całe życie narażenia słodkowodnych muchówek z gatunku *Chironomus* na działanie substancji chemicznych i obejmuje w całości pierwsze pokolenie (pokolenie P) oraz początek drugiego pokolenia (pokolenie F1). Stanowi ona rozszerzenie istniejących metod badawczych C.28 (1) lub C.27 (15), w których stosuje się, odpowiednio, scenariusz narażenia we wzbogaconej wodzie lub scenariusz narażenia we wzbogaconym osadzie. Uwzględnia się w niej protokoły badania toksyczności obowiązujące dla *Chironomus riparius* i *Chironomus dilutus* (zwanego wcześniej *C. tentans* (2)), które opracowano w Europie i Ameryce Płn. (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9), a następnie potwierdzono w badaniach międzylaboratoryjnych (1) (7) (10) (11) (12). Możliwe jest również zastosowanie innych dobrze udokumentowanych gatunków ochotkowatych, np. *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Całkowity czas trwania narażenia wynosi około 44 dni w przypadku *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a w przypadku *C. dilutus* – około 100 dni.

2. W niniejszej metodzie badawczej opisano zarówno scenariusz narażenia w wodzie, jak i w osadzie. Wybór odpowiedniego scenariusza narażenia zależy od zamierzonego zastosowania badania. Scenariusz narażenia w wodzie, polegający na wzbogaceniu słupa wody, służy do symulacji znoszenia cieczy roboczej w przypadku pestycydów i obejmuje początkowe szczytowe stężenie w wodzie powierzchniowej. Wzbogacenie wody jest również przydatne w odniesieniu do innych rodzajów narażenia (w tym wycieków chemicznych), z wyjątkiem procesów akumulacji w osadzie trwających dłużej niż okres badania. W tym przypadku, a także w przypadku gdy główną drogą przedostawania się pestycydów do akwenów wodnych jest ich spływanie, bardziej właściwy może być projekt badania wzbogaconego osadu. Jeżeli przedmiotem zainteresowania są inne scenariusze narażenia, projekt badania można łatwo dostosować. Na przykład jeżeli dystrybucja badanej substancji chemicznej między fazę wodną i warstwę osadu nie jest przedmiotem zainteresowania oraz jeżeli należy zminimalizować adsorpcję przez osad, można rozważyć wykorzystanie zastępczego sztucznego osadu (np. piasku kwarcowego).

3. Substancje chemiczne, które wymagają badania na organizmach żyjących w osadach, mogą pozostawać w osadzie przez długi czas. W odniesieniu do organizmów żyjących w osadach możliwe są różne drogi narażenia. Względne znaczenie danej drogi narażenia i czas, w jakim każda z tych dróg przyczynia się do ogólnego efektu toksycznego, zależą od fizykochemicznych właściwości danej substancji chemicznej. W przypadku silnie adsorbujących substancji chemicznych lub w przypadku substancji chemicznych tworzących wiązania kowalencyjne z osadem znaczącą drogą narażenia może być przyjmowanie zanieczyszczonego pokarmu. Aby zapobiec niedoszacowaniu toksyczności wysokolipofilowych substancji chemicznych, można rozważyć dodanie pokarmu do osadu przed wprowadzeniem badanej substancji chemicznej (zob. pkt 31). W ten sposób możliwe jest uwzględnienie wszystkich dróg narażenia na każdym z etapów życia.

4. Mierzone punkty końcowe obejmują: całkowitą liczbę przepoczwarzonych osobników dorosłych (w odniesieniu do pierwszego i drugiego pokolenia), tempo rozwoju (dla pierwszego i drugiego pokolenia), proporcję płci w odniesieniu do w pełni przepoczwarzonych i żywych osobników dorosłych (pierwszego i drugiego pokolenia), liczbę sznurów jaj przypadającą na samicę (tylko pierwsze pokolenie) oraz płodność sznurów jaj (tylko pierwsze pokolenie).

5. Zdecydowanie zaleca się stosowanie osadu preparowanego. Osad preparowany posiada szereg zalet, których nie mają osady naturalne:

▼M6

— zmienność eksperymentalna jest ograniczona, ponieważ osad preparowany stanowi odtwarzalną „standardową matrycę” i wyeliminowana zostaje potrzeba znalezienia źródła niezanieczyszczonego, czystego osadu;

— badania można rozpocząć w każdej chwili, unikając zmienności sezonowej badanego osadu, i nie ma konieczności poddawania osadu wstępnej obróbce w celu usunięcia rodzimej fauny;

— mniejsze koszty w porównaniu z pobieraniem w terenie dostatecznych ilości osadu dla potrzeb rutynowych badań.

— zastosowanie osadu preparowanego umożliwia porównanie toksyczności między badaniami oraz stosowną klasyfikację substancji chemicznych (3).

6. Zastosowane definicje są zamieszczone w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

7. Larwy ochotkowatych w pierwszym stadium larwalnym poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej o różnym stopniu stężenia w układzie osad-woda. Badanie rozpoczyna się od umieszczenia larw w pierwszym stadium larwalnym (pierwsze pokolenie) w zlewkach badawczych zawierających wzbogacony osad albo badaną substancję chemiczną dodaje się do wody po dodaniu larw. Ocenia się wylęg ochotkowatych, czas do wylęgu oraz proporcję płci w odniesieniu do w pełni przepoczwarzonych i żywych muchówek. Przepoczwarzone osobniki dorosłe przenosi się do klatek hodowlanych w celu ułatwienie rojenia, godów i składania jaj. Ocenie podlega liczba sznurów jaj i ich płodność. Z tych sznurów jaj pozyskuje się larwy w pierwszym stadium larwalnym z drugiego pokolenia. Larwy umieszcza się w świeżo przygotowanych zlewkach badawczych (procedura wzbogacania taka sama jak w przypadku pierwszego pokolenia) w celu określenia żywotności drugiego pokolenia poprzez ocenę wylęgu, czasu do wylęgu oraz proporcji płci w odniesieniu do w pełni przepoczwarzonych i żywych muchówek (schemat badania cyklu życia zamieszczony jest w dodatku 5). Wszystkie dane analizuje się przy użyciu modelu regresji w celu oszacowania stężenia, które spowodowałoby X % zmniejszenie w odniesieniu do danego punktu końcowego albo w drodze testowania hipotez w celu oznaczenia stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC). To ostatnie wymaga porównania reakcji na zabieg z reakcjami odpowiednich prób kontrolnych za pomocą badań statystycznych. Należy zauważyć, że w przypadku scenariusza z zastosowaniem wzbogaconej wody w odniesieniu do szybko rozkładających się substancji chemicznych na późniejszych etapach życia każdego pokolenia (np. stadium poczwarki) zwierzęta mogą być narażone na znacznie niższy poziom stężenia w wodzie nadosadowej niż larwy w pierwszym stadium rozwoju larwalnego. Jeżeli stanowi to problem, a w przypadku każdego stadium konieczne jest zastosowanie porównywalnego poziomu narażenia, można rozważyć następujące zmiany metody badawczej:

— równoległe serie z wzbogacaniem na różnych etapach życia lub

— powtarzane wzbogacanie (lub odnawianie wody nadosadowej) w układzie badawczym w ciągu obydwu faz badania (pierwsze i drugie pokolenie), przy czym odstępy czasowe między wzbogacaniem (wymianą) powinny być dostosowane do charakterystyki losów badanej substancji chemicznej.

Zmiany takie są możliwe tylko w przypadku scenariusza ze wzbogaconą wodą, a nie ze wzbogaconym osadem.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

8. Należy znać rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w wodzie, prężność par i log K_{ow} oraz ilość substancji, która przedostała się do osadu oraz jej stabilność w wodzie i osadzie, uzyskane w wyniku pomiarów lub obliczeń. Powinna być dostępna wiarygodna metoda analityczna do oznaczania ilościowego badanej substancji chemicznej w osadzie, wodzie porowej i warstwie wody nadosadowej ze znaną i udokumentowaną dokładnością oraz granicą wykrywalności. Użyteczne informacje obejmują wzór strukturalny i czystość badanej substancji chemicznej. Przydatne są także

▼M6

dane dotyczące chemicznych losów badanej substancji chemicznej w środowisku (np. jej rozpraszanie się, rozkład abiotyczny i biotyczny itd.). Dalsze wskazówki dotyczące badania substancji chemicznych o własnościach fizykochemicznych utrudniających ich badanie podano w pozycji (16) bibliografii.

SUBSTANCJE CHEMICZNE ODNIESIENIA

9. Można okresowo badać chemiczne substancje odniesienia, aby upewnić się, czy wrażliwość populacji laboratoryjnej nie uległa zmianie. W przypadku rozwielitek wystarczające byłoby przeprowadzenie 48-godzinnego badania toksyczności ostrej (zgodnie z 17). Dopóki jednak nie będą dostępne wytyczne dotyczące zweryfikowanego badania toksyczności ostrej, można rozważyć zastosowanie badania toksyczności przewlekłej zgodnie z rozdziałem C.28 niniejszego załącznika. Przykłady toksycznych substancji odniesienia stosowanych z powodzeniem w badaniach międzylaboratoryjnych i badaniach weryfikacyjnych to: lindan, trifluralina, pentachlorofenol, chlorek kadmu i chlorek potasu. (1) (3) (6) (7) (18).

WAŻNOŚĆ BADANIA

10. Aby badanie było ważne, muszą zostać spełnione następujące warunki:

— średni odsetek wylęgniętych osobników dorosłych w próbie kontrolnej poddanej zabiegowi powinien wynosić co najmniej 70 % na koniec okresu narażenia dla obydwu pokoleń (1) (7);

— w odniesieniu do *C. riparius* i *C. yoshimatsui* 85 % wszystkich przepoczwarzonych dorosłych muchówek z próby kontrolnej poddanej zabiegowi w obydwu pokoleniach powinno pojawić się w okresie 12–23 dni po wprowadzeniu do naczyń larw w pierwszym stadium larwalnym; w odniesieniu do *C. dilutus* dopuszcza się okres 20–65 dni;

— średnia proporcja płci wśród w pełni przepoczwarzonych i żywych osobników dorosłych (jako odsetek samic lub samców) w próbie kontrolnej poddanej zabiegowi w obydwu pokoleniach powinna wynosić co najmniej 0,4, ale nie powinna przekraczać 0,6;

— w odniesieniu do każdej klatki hodowlanej liczba sznurów jaj w próbach kontrolnych pierwszego pokolenia powinna wynosić co najmniej 0,6 na samicę dodaną do klatki hodowlanej;

— w odniesieniu do każdej klatki hodowlanej odsetek sznurów zapłodnionych jaj w próbach kontrolnych pierwszego pokolenia powinien wynosić co najmniej 0,6;

— na końcu okresu narażenia obydwu generacji należy zmierzyć wartość pH oraz stężenie rozpuszczonego tlenu w każdym naczyniu. Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 60 % wartości nasycenia powietrzem (ASV ([1])), a wartość pH w warstwie wody nadosadowej powinna we wszystkich naczyniach badawczych mieścić się w przedziale 6–9;

— temperatura wody nie powinna różnić się o więcej niż ± 1,0 °C.

OPIS METODY

Naczynia badawcze i klatki hodowlane

11. Larwy poddaje się narażeniu na działanie danej substancji w szklanych zlewkach o pojemności 600 ml i średnicy około 8,5 cm (zob. dodatek 5). Inne naczynia także mogą nadawać się do badań, powinny jednak zapewniać odpowiednią grubość warstwy osadu i wody nadosadowej. Powierzchnia osadu powinna być wystarczająca, by zapewnić 2–3 cm_2 na larwę. Stosunek grubości warstwy osadu do warstwy wody nadosadowej powinien wynosić około 1:4. Należy zastosować klatki hodowlane (minimum 30 cm dla wszystkich trzech wymiarów) z siatką (rozmiar oczek około 1 mm) na górze i należy wykorzystać co najmniej jedną stronę klatki (zob. dodatek 5). W każdej klatce umieszcza się krystalizator

([1]) W temperaturze 20 °C przy zwykłym ciśnieniu atmosferycznym wartość nasycenia powietrzem w wodach słodkich równa się 9,1 mg/l (60 % równa się 5,46 mg/l).

▼M6

o pojemności 2 l do składnia jaj, zawierający wodę badawczą i osad. Również w przypadku krystalizatora stosunek grubości warstwy osadu do warstwy wody nadosadowej powinien wynosić około 1:4. Po zebraniu z krystalizatorów sznurów jaj umieszcza się je na 12-dołkowej mikropłytce (jeden sznur na dołek zawierający co najmniej 2,5 ml wody ze wzbogaconego krystalizatora), następnie płytki przykrywa się pokrywą, aby zapobiec znacznemu parowaniu. Wykorzystać można również inne naczynia nadające się do umieszczenia w nich sznurów jaj. Z wyjątkiem mikropłytek wszystkie naczynia badawcze i inne przyrządy mające kontakt z układem badawczym powinny być w całości wykonane ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału (np. politetrafluoroetylenu).

Wybór gatunków

12. Gatunkiem wykorzystywanym w badaniu powinien być w miarę możliwości *Chironomus riparius*. Można także użyć C. *yoshimatsui*. *C. dilutus* jest także odpowiedni, ale jest trudniejszy w hodowli i wymaga dłuższego okresu badania. Szczegóły dotyczące metod hodowli w odniesieniu do *C. riparius* podano w dodatku 2. Informacje dotyczące warunków hodowli są także dostępne dla *C. dilutus* (5) i *C. yoshimatsui* (14). Przed przeprowadzeniem badania należy potwierdzić identyfikację gatunków, ale nie jest to wymagane przed każdym badaniem, jeśli organizmy pochodzą z hodowli wewnątrzlaboratoryjnej.

Osad

13. W miarę możliwości należy stosować osad preparowany (zwany także osadem regenerowanym, sztucznym lub syntetycznym). Jeśli jednak korzysta się z osadu naturalnego, należy go opisać (podając co najmniej pH, zawartość węgla organicznego, zaleca się także określenie innych parametrów, takich jak stosunek C/N i granulometrię). Osad taki powinien być wolny od zanieczyszczeń i innych organizmów, które mogłyby konkurować z ochotkowatymi lub zjadać ich larwy. Zaleca się również, aby osad przed badaniem był przez siedem dni kondycjonowany w warunkach badania. Zaleca się zastosowanie następującego osadu preparowanego (1) (20) (21), jak opisano w (1):

a. 4–5 % torfu (w przeliczeniu na suchą masę); pH jak najbardziej zbliżone do 5,5–6,0; ważne jest, by stosować torf w postaci sproszkowanej, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 1 mm) i suszony wyłącznie powietrzem;

b. 20 % glinki kaolinowej (w przeliczeniu na suchą masę) (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);

c. 75–76 % piasku kwarcowego (w przeliczeniu na suchą masę) (powinien przeważać drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek ma wielkość 50–200 μm);

d. w celu uzyskania wilgotności końcowej mieszaniny na poziomie od 30–50 % dodaje się wodę dejonizowaną;

e. w celu skorygowania pH końcowej mieszaniny osadu do wartości 7,0 ± 0,5 dodaje się do niej chemicznie czysty węglan wapnia ($CaCO_3$);

f. zawartość węgla organicznego w końcowej mieszaninie powinna wynosić 2 % (± 0,5 %) i należy ją skorygować przy użyciu odpowiednich ilości torfu i piasku, zgodnie z lit. a) i c).

14. Źródło torfu, glinki kaolinowej i piasku powinno być znane. Składniki osadu należy sprawdzić pod kątem zanieczyszczenia chemicznego (np. metalami ciężkimi, związkami chloroorganicznymi, związkami fosforoorganicznymi). W dodatku 3 podano przykładowy sposób przygotowania

▼M6

osadu preparowanego. Dopuszczalne jest także mieszanie suchych składników, o ile zostanie wykazane, że po dodaniu warstwy wody nadosadowej składniki osadu nie rozdzielają się (np. nie unoszą się cząstki torfu) oraz że torf lub osad został poddany dostatecznemu kondycjonowaniu.

Woda

15. Jako wodę do badania można stosować każdy rodzaj wody, której charakterystyka zgodna jest z charakterystyką chemiczną wody rozcieńczającej, jak opisano w dodatkach 2 i 4. Do hodowli ochotkowatych i do badania może służyć każdy odpowiedni rodzaj wody, np. woda naturalna (powierzchniowa lub gruntowa), woda regenerowana (zob. dodatek 2) lub odchlorowana woda wodociągowa, pod warunkiem że ochotkowate przeżyją w niej przez okres hodowli i badania bez wykazywania oznak stresu. Na początku badania wartość pH wody użytej do badania powinna wynosić 6–9, a twardość ogółem wody w przeliczeniu na $CaCO_3$ nie powinna być wyższa niż 400 mg/l. Jeżeli jednak zachodzi podejrzenie interakcji jonów powodujące twardość wody i badanej substancji chemicznej, należy użyć wody o mniejszej twardości (zatem nie należy w takim przypadku stosować roztworu Elendta M4). Przez okres całego badania należy stosować ten sam rodzaj wody. Cechy jakości wody wymienione w dodatku 4 należy mierzyć co najmniej dwa razy w roku lub każdorazowo kiedy zachodzi podejrzenie, że mogły ulec znacznej zmianie.

Roztwory podstawowe – wzbogacona woda

16. a. Badane stężenia oblicza się na podstawie stężeń w słupie wody, tj. w warstwie wody nadosadowej. Roztwory do badań o wybranych stężeniach są zwykle sporządzane przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Zaleca się przygotować roztwory podstawowe, rozpuszczając badaną substancję chemiczną w wodzie badawczej. W niektórych przypadkach wymagane może być stosowanie rozpuszczalników lub środków dyspergujących w celu uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Przykładami odpowiednich rozpuszczalników są aceton, eter monoetylowy glikolu etylenowego, eter dimetylowy glikolu etylenowego, dimetyloformamid i glikol trójetylenowy. Dopuszczalne środki dyspergujące to Cremophor RH40, Tween 80, metyloceluloza 0,01 % i HCO-40. Stężenie środka rozpuszczającego w podłożu do badania końcowego powinno być minimalne (tj. $\leq$ 0,1 ml/l) i jednakowe we wszystkich badaniach. W przypadku zastosowania środka rozpuszczającego nie powinien on mieć żadnego znaczącego wpływu na przeżycie, co należy wykazać w próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem w porównaniu z ujemną próbą kontrolną (woda). Należy jednak dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć stosowania takich substancji.

Roztwory podstawowe – wzbogacony osad

16. b. Wzbogacone osady o wybranym stężeniu substancji badanej są zwykle przygotowywane przez dodanie roztworu tej substancji chemicznej bezpośrednio do osadu. Roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w dejonizowanej wodzie miesza się z osadem preparowanym z użyciem rozdrabniacza, mieszalnika lub ręcznie. Jeżeli badana substancja chemiczna słabo rozpuszcza się w wodzie, można ją rozpuścić w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym, w jak najmniejszej jego ilości (np. w heksanie, acetonie lub chloroformie). Roztwór taki następnie miesza się z drobnym piaskiem kwarcowym w ilości 10 gramów na każde naczynie badawcze. Pozostawia się go do całkowitego odparowania rozpuszczalnika, aby został całkowicie usunięty z piasku; następnie piasek miesza się z odpowiednią ilością osadu. Do rozpuszczenia, dyspergowania lub emulsyfikacji badanej substancji chemicznej mogą być użyte jedynie łatwo ulatniające się czynniki. Należy mieć na uwadze, że przy preparowaniu osadu należy uwzględniać piasek zawarty

▼M6

w mieszaninie badanej substancji chemicznej i piasku (czyli osad należy przygotować z mniejszą ilością piasku). Należy dopilnować, by badana substancja chemiczna dodana do osadu została w nim starannie i równomiernie rozprowadzona. W razie konieczności dla określenia jednorodności mieszaniny podpróbki należy poddać analizie.

PROJEKT BADANIA

17. Projekt badania obejmuje dobór liczby i rozstawienie badanych stężeń, dobór liczby naczyń zawierających każde badane stężenie, liczby larw na jedno naczynie, liczby krystalizatorów i klatek hodowlanych. Poniżej przedstawiono opisy projektów dla oszacowania wartości EC_x, NOEC i badania granicznego.

Projekt analizy regresyjnej

18. Należy objąć badaniem stężenie efektywne (EC_x,) i zakres stężeń, które są przedmiotem zainteresowania, tak aby punkt końcowy nie był ekstrapolowany poza zebrane dane. Należy unikać ekstrapolowania wyników znacznie poniżej najniższego lub powyżej najwyższego stężenia. Wstępne badanie ustalające zakres zgodne z metodami badań C.27 lub C.28 może być pomocne przy wyborze odpowiedniego zakresu badanych stężeń.

19. W przypadku podejścia opartego na EC_x wymaganych jest co najmniej pięć stężeń, a dla każdego stężenia – osiem kontrprób. W przypadku każdego stężenia należy zastosować dwie klatki hodowlane (A i B). Osiem kontrprób dzieli się na dwie grupy po cztery kontrpróby każda na potrzeby każdej klatki hodowlanej. To połączenie kontrprób jest konieczne ze względu na liczbę muchówek w klatce niezbędnych do przeprowadzenia prawidłowej oceny rozmnażania. Drugie pokolenie ma jednak ponownie osiem kontrprób, które powstają z narażonych populacji w klatkach hodowlanych. Współczynnik rozstawienia stężeń nie powinien przekraczać dwóch (z wyjątkiem przypadków, gdy krzywa dawka–efekt ma łagodny przebieg). Liczbę kontrprób dla każdego zabiegu można zmniejszyć do sześciu (trzy na każdą hodowlę), jeśli zwiększy się liczbę badanych stężeń dających różne reakcje. Zwiększanie liczby kontrprób lub zmniejszanie rozstawienia badanych stężeń zwykle prowadzi do zawężenia przedziałów ufności wokół wartości EC_x.

Projekt dotyczący oszacowania NOEC

20. W celu oznaczenia wartości NOEC należy zastosować pięć stężeń substancji badanej z co najmniej ośmioma kontrpróbami (4 dla każdej klatki hodowlanej, A i B), a rozstawienie stężeń nie powinno przekraczać dwóch. Liczba kontrprób powinna być na tyle duża, by zapewnić odpowiednią moc statystyczną dla wykrycia 20 % różnicy w stosunku do próby kontrolnej przy poziomie istotności wynoszącym 5 % ($\alpha = 0{,}05$). W odniesieniu do tempa rozwoju, potencjału reprodukcyjnego i płodności zwykle stosuje się analizę wariancji (ANOVA), a następnie test Dunnetta i test Williamsa (22–25). W odniesieniu do wskaźnika wylęgu i proporcji płci można zastosować test Cochrana-Armitage'a, test dokładny Fishera (z korektą Bonferroniego) lub test Mantela-Haenszela.

Badanie graniczne

21. Jeśli w opcjonalnym wstępnym badaniu ustalającym zakres nie zaobserwowano żadnych zmian aż do poziomu maksymalnego stężenia, można przeprowadzić badanie graniczne (jedno badane stężenie i jedna próba kontrolna). Badanie graniczne ma na celu wskazanie, że toksyczne skutki badanej substancji chemicznej występują przy wyższych poziomach stężenia niż zbadane stężenie graniczne. W przypadku wody sugeruje się 100 mg/l, a w przypadku osadu 1 000 mg/kg (suchej masy). Zazwyczaj niezbędne jest co najmniej osiem kontrprób zarówno na potrzeby zabiegu, jak i próby kontrolnej. Należy wykazać odpowiednią moc statystyczną, która pozwala wykryć 20 % różnicę w porównaniu z próbą

▼M6

kontrolną przy 5 % poziomie istotności (α = 0,05). Przy odpowiedziach metrycznych (np. tempo rozwoju) odpowiednią metodą statystyczną jest test t-Studenta, jeżeli dane spełniają warunki tego testu (normalność rozkładu zmiennych, jednorodność wariancji). Jeśli te warunki nie są spełnione, można zastosować test t-Studenta dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, np. test Manna-Whitneya-Wilcoxona. W przypadku wskaźnika wylęgu odpowiedni jest test dokładny Fishera.

PROCEDURA

Warunki narażenia na działanie substancji

Przygotowanie układu woda-osad (wzbogacanie wody)

22. a) Do każdego z naczyń badawczych i krystalizatorów wprowadza się spreparowany osad (zob. pkt 13–14 i dodatek 3), tak aby powstała warstwa o grubości co najmniej 1,5 cm (w przypadku krystalizatora może ona być nieco mniejsza), ale nie większej niż 3 cm. Aby stosunek grubości warstwy osadu do warstwy wody nie przekraczał 1:4, należy dodać wody (zob. pkt 15). Po przygotowaniu naczyń badawczych układ osad-woda należy delikatnie napowietrzać przez około siedem dni przed dodaniem larw w pierwszym stadium larwalnym pierwszego i drugiego pokolenia (zob. pkt 14 oraz dodatek 3). Układ osad-woda złożony z krystalizatorów nie jest napowietrzany podczas badania, ponieważ nie ma potrzeby wspomagania przeżycia larw (przed wylęgiem sznury jaj zostały już zebrane). Podczas dodawania wody do badania, w celu uzyskania warstwy wody nadosadowej i aby uniknąć oddzielenia składników osadu i ponownego zawieszenia w wodzie drobnoziarnistego materiału, osad można nakryć krążkiem z tworzywa sztucznego. Następnie krążek należy bezzwłocznie usunąć. Właściwe może być także zastosowanie innych przyrządów.

Przygotowanie układu woda-osad (wzbogacony osad)

22. b) Wzbogacony osad sporządzony zgodnie z pkt 16b umieszcza się w naczyniach i krystalizatorze, a następnie dodaje się wodę nadosadową, aby uzyskać stosunek objętości osadu do wody równy 1:4. Grubość warstwy osadu powinna mieścić się w przedziale 1,5–3 cm (w przypadku krystalizatora może być nieco mniejsza). Podczas dodawania wody do badania, w celu uzyskania warstwy wody nadosadowej i aby uniknąć oddzielenia składników osadu i ponownego zawieszenia w wodzie drobnoziarnistego materiału, osad można nakryć krążkiem z tworzywa sztucznego, a następnie krążek bezzwłocznie usunąć. Właściwe może być także zastosowanie innych przyrządów. Po przygotowaniu wzbogaconego osadu z wodą nadosadową należałoby umożliwić rozdzielenie badanej substancji chemicznej między fazę wodną i osad (4) (5) (7) (18). W miarę możliwości powinno się to odbywać w takich samych warunkach temperatury i napowietrzenia, jakie zastosowano na potrzeby badania. Okres ustalania stanu równowagi zależy od osadu i substancji chemicznej i może trwać kilka godzin lub kilka dni, a w rzadkich przypadkach do pięciu tygodni. Ponieważ w tym czasie wiele substancji chemicznych może ulec rozkładowi, nie oczekuje się uzyskania stanu równowagi, ale zaleca się stosowanie 48-godzinnego okresu wyrównania stężeń. Jeżeli jednak połowiczny czas rozpadu substancji chemicznej w osadzie jest długi (zob. pkt 8), czas wyrównania stężeń można przedłużyć. Na zakończenie tego dodatkowego okresu wyrównywania stężeń należy zmierzyć stężenie badanej substancji chemicznej w wodzie nadosadowej, wodzie porowej i w osadzie co najmniej przy najwyższym stężeniu i przy niższym stężeniu (zob. pkt 38). Takie oznaczenia analityczne badanej substancji chemicznej umożliwiają obliczenie bilansu masy i wyrażenie wyników w oparciu o zmierzone stężenia.

23. Naczynia badawcze należy przykryć (np. szklanymi płytkami). W razie konieczności w czasie badania poziom wody można uzupełnić do pierwotnej objętości, aby wyrównać brak spowodowany parowaniem. Należy do tego celu użyć wody destylowanej lub wody dejonizowanej, aby zapobiec odkładaniu się soli. Krystalizatory w klatkach hodowlanych nie są

▼M6

przykrywane i mogą, choć nie muszą, być uzupełniane wodą, aby wyrównać straty wody w trakcie badania, ponieważ sznury jaj są w kontakcie z wodą w przybliżeniu tylko przez jeden dzień, a naczyń używa się tylko podczas krótkiej fazy badania.

Dodanie organizmów użytych do badania

24. Na cztery do pięciu dni przed dodaniem larw w pierwszym stadium larwalnym pierwszego pokolenia pakiety jaj należy wyjąć z hodowli i umieścić w małych naczyniach w pożywce hodowlanej. Można w tym celu zastosować pożywkę wykorzystywaną w hodowli wyjściowej lub świeżo przygotowaną pożywkę. W obu przypadkach do pożywki hodowlanej należy dodać niewielką ilość pokarmu, np. kilka kropel filtratu z drobno zmielonej zawiesiny pokarmu w płatkach dla ryb (zob. dodatek 2). Należy wykorzystać wyłącznie świeżo złożone pakiety jaj. Wylęg larw zaczyna się przeważnie kilka dni po złożeniu jaj (2–3 dni w przypadku *C. riparius* w temperaturze 20 °C oraz 1–4 dni w przypadku *C. dilutus* w temperaturze 23 °C i *C. yoshimatsui* w temperaturze 25 °C), a wzrost larw następuje w czterech stadiach larwalnych, z których każde trwa 4–8 dni. Do badania należy użyć larw w pierwszym stadium larwalnym (maksymalnie 48 h po wylęgu). Stadium larwalne larw można sprawdzić, mierząc szerokości puszki głowowej (7).

25. Dwadzieścia larw w pierwszym stadium larwalnym z pierwszego pokolenia przydziela się losowo do każdego naczynia doświadczalnego zawierającego układ osad-woda za pomocą tępo zakończonej pipety. Po umieszczeniu larw w naczyniach należy wstrzymać napowietrzanie wody i nie uruchamiać go przez dobę po ich wprowadzeniu (zob. pkt 32). Zgodnie z zastosowanym projektem badania (zob. pkt 19 i 20) w przypadku podejścia EC_x należy użyć co najmniej 120 larw na stężenie, a w przypadku podejścia NOEC – 160 larw (8 kontrprób na stężenie). W projekcie ze wzbogaconym osadem narażenie zaczyna się w momencie dodania larw.

Wzbogacenie wody nadosadowej

26. Po upływie dwudziestu czterech godzin od dodania larw w pierwszym stadium rozwoju larwalnego z pierwszego pokolenia wodę nadosadową wzbogaca się badaną substancją chemiczną i ponownie uruchamia delikatne napowietrzanie (ewentualne zmiany w projekcie badania zostały opisane w pkt 7). Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej wprowadza się w małych ilościach pod powierzchnię wody za pomocą pipety. Wodę nadosadową należy następnie ostrożnie zamieszać, tak aby nie poruszyć osadu. W projekcie ze wzbogaconą wodą narażenie zaczyna się w momencie wzbogacenia wody (tj. po upływie jednego dnia od dodania larw).

Zbieranie przepoczwarzonych osobników dorosłych

27. Przepoczwarzone muchówki z pierwszego pokolenia zbiera się co najmniej raz, a najlepiej dwa razy dziennie (zob. pkt 36) z naczyń doświadczalnych za pomocą aspiratora, wentylatora wyciągowego lub podobnego urządzenia (zob. dodatek 5). Należy zachować szczególną uwagę, aby nie uszkodzić dorosłych osobników. Zebrane muchówki z czterech naczyń badawczych z jednego zabiegu uwalnia się do klatki hodowlanej, do której zostały uprzednio przypisane. W dniu pierwszego wylęgu (samców) do krystalizatora wprowadza się pod powierzchnię wody małą ilość roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej za pomocą pipety (projekt ze wzbogaconą wodą). Wodę nadosadową należy następnie ostrożnie zamieszać, tak aby nie poruszyć osadu. Stężenie badanej substancji chemicznej w krystalizatorze jest nominalnie takie samo jak w naczyniach zabiegowych przypisanych do danej klatki

▼M6

hodowlanej. W przypadku projektu ze wzbogaconym osadem krystalizatory przygotowuje się w przybliżeniu w 11. dniu po rozpoczęciu narażenia (tj. dodaniu larw z pierwszego pokolenia), aby stabilizowały się przez około 48 godzin przed wytworzeniem pierwszych sznurów jaj.

28. Sznury jaj wybiera się z krystalizatora w klatce hodowlanej za pomocą pęsety lub tępo zakończonej pipety. Każdy sznur jaj umieszcza się w naczyniu zawierającym podłoże hodowlane z krystalizatora, z którego został on pobrany (np. w dołku mikropłytki 12-dołkowej z co najmniej 2,5 ml pożywki). Naczynia ze sznurami jaj przykrywa się pokrywą w celu uniknięcia znacznego parowania. Sznury jaj przechowuje się do celów obserwacji przez co najmniej sześć dni od ich powstania w celu ich sklasyfikowania jako zapłodnione lub niezapłodnione.

Aby zapoczątkować drugie pokolenie, z każdej klatki hodowlanej wybiera się co najmniej trzy, a najlepiej sześć sznurów zapłodnionych jaj i pozostawia do wylęgnięcia z pewną ilością pokarmu. Te sznury jaj powinny powstać w szczytowym momencie okresu składania jaj, co zwykle następuje około 19. dnia badania w próbach kontrolnych. Najlepiej byłoby, gdyby drugie pokolenie ze wszystkich zabiegów było zapoczątkowane tego samego dnia, czasami może się to jednak okazać niemożliwe ze względu na wpływ substancji chemicznej na rozwój larw. W takim przypadku stosowanie wyższych stężeń można zapoczątkować później niż zabiegi z niższymi dawkami i z próbą kontrolną (z rozpuszczalnikiem).

29. a) W projekcie ze wzbogaconą wodą układ osad-woda dla drugiego pokolenia przygotowuje się, wzbogacając warstwę wody nadosadowej substancją chemiczną na około 1 godzinę przed dodaniem larw w pierwszym stadium larwalnym do naczyń badawczych. Roztwory badanej substancji chemiczną wprowadza się w małych ilościach pod powierzchnię wody za pomocą pipety. Wodę nadosadową należy następnie ostrożnie zamieszać, tak aby nie poruszyć osadu. Po wzbogaceniu zapewnia się delikatne napowietrzanie.

29. b) W projekcie ze wzbogaconym osadem naczynia poddawane narażeniu, zawierające układ osad-woda dla drugiego pokolenia, przygotowuje się w taki sam sposób jak dla pierwszego pokolenia.

30. Dwadzieścia larw w pierwszym stadium larwalnym (maksymalnie 48 h po wykluciu) z drugiego pokolenia przydziela się losowo do każdego naczynia badawczego zawierającego wzbogacony układ osad-woda za pomocą tępo zakończonej pipety. Po wprowadzeniu larw w pierwszym stadium larwalnym do naczyń należy wstrzymać napowietrzanie wody i nie uruchamiać go przez dobę od ich wprowadzenia. Zgodnie z zastosowanym projektem badania (zob. pkt 19 i 20) w przypadku podejścia EC_x należy użyć co najmniej 120 larw na stężenie (6 kontrprób na stężenie), a w przypadku podejścia NOEC – 160 larw (8 kontrprób na stężenie).

Pokarm

31. Larwy w naczyniach badawczych należy karmić w miarę możliwości codziennie lub co najmniej trzy razy w tygodniu. Do karmienia młodych larw przez pierwsze 10 dni rozwoju nadaje się pokarm dla ryb (zawiesina w wodzie lub drobno zmielony pokarm, np. Tetra-Min lub Tetra-Phyll; zob. szczegółowe informacje w dodatku 2) w ilości 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg w przypadku *C. yoshimatsui*) na larwę dziennie. Starsze larwy mogą potrzebować nieco więcej pokarmu: 0,5–1,0 mg na larwę dziennie powinno stanowić wystarczającą ilość przez pozostałą część badania. Jeśli zaobserwuje się wzrost grzybów lub śmiertelność w próbach kontrolnych, należy wówczas we wszystkich zabiegach i próbach kontrolnych ograniczyć dawki pokarmu. Jeśli nie można powstrzymać rozwoju grzybów, należy powtórzyć badanie.

Znaczenie toksykologiczne narażenia drogą pokarmową jest ogólnie wyższe w przypadku substancji chemicznych o wysokim powinowactwie do węgla organicznego lub substancji chemicznych tworzących wiązania

▼M6

kowalencyjne z osadem. W związku z tym przy badaniu substancji chemicznych o takich właściwościach ilość pokarmu niezbędną do zapewnienia przeżycia i naturalnego wzrostu larw można dodać do osadu preparowanego przed okresem stabilizacji, w zależności od zapotrzebowania przewidzianego przepisami. Aby zapobiec pogorszeniu jakości wody, zamiast pokarmu dla ryb należy użyć surowca roślinnego, np. dodatku 0,5 % (w przeliczeniu na suchą masę) drobno zmielonych liści pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*), morwy białej (*Morus alba*), koniczyny białej (*Trifolium repens*), szpinaku (*Spinacia oleracea*) lub innego surowca roślinnego (produktu *Cerophyl* lub alfa-celulozy). Dodanie pełnej dawki pokarmowej organicznego źródła pokarmu do osadu przed wzbogaceniem nie jest bez znaczenia w odniesieniu do jakości wody i działania biologicznego (21) ani nie jest metodą standardową, jednak ostatnie badania wskazują, że metoda ta jest skuteczna (19) (26). Dorosłe muchówki w klatce hodowlanej zwykle nie wymagają karmienia, jednak podanie tamponu z wełny bawełnianej nasączonego nasyconym roztworem sacharozy jako źródła pokarmu dla przepoczwarzonych osobników dorosłych zwiększa potencjał reprodukcyjny i płodność (34).

Warunki inkubacji

32. Po upływie 24 godzin od wprowadzenia larw w pierwszym stadium larwalnym obu generacji rozpoczyna się delikatnie napowietrzanie warstwy wody nadosadowej w naczyniach badawczych, które kontynuuje się przez cały okres badania (należy dbać, aby stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadło poniżej 60 % ASV). Napowietrzanie prowadzi się z użyciem szklanej pipety Pasteura, której wylot znajduje się 2–3 cm nad warstwą osadu, w ilości kilku pęcherzyków powietrza/sek. Przy badaniu lotnych chemikaliów można rozważyć rezygnację z napowietrzania układu osad-woda, jednocześnie należy jednak spełnić kryterium ważności wynoszące co najmniej 60 % ASV (pkt 10). Dalsze wytyczne przedstawiono w (16).

33. Badanie z wykorzystaniem *C. riparius* przeprowadza się w stałej temperaturze 20 °C (± 2 °C). Zalecane temperatury w przypadku *C. dilutus* i *C. yoshimatsui* to odpowiednio 23 °C i 25 °C (± 2 °C). Stosuje się 16-godzinny fotoperiod, a natężenie światła powinno wynosić 500–1 000 luksów. W przypadku klatek hodowlanych można uwzględnić dodatkowo jednogodzinną fazę brzasku i zmierzchu.

Okres narażenia

34. Projekt ze wzbogaconą wodą: w odniesieniu do pierwszego pokolenia okres narażenia zaczyna się w momencie wzbogacenia wody nadosadowej w naczyniu badawczym (co ma miejsce następnego dnia po umieszczeniu larw – ewentualne zmiany w projekcie narażenia przedstawiono w pkt 7). Narażenie drugiego pokolenia larw zaczyna się natychmiast, ponieważ umieszcza się je w układzie osad-woda, który został już wzbogacony. W odniesieniu do *C. riparius* i *C. yoshimatsui* maksymalny okres narażenia dla pierwszego pokolenia wynosi 27 dni, zaś dla drugiego pokolenia – 28 dni (larwy z pierwszego pokolenia spędzają jeden dzień w naczyniu bez narażenia). Uwzględniając nakładanie się okresów, całkowity czas badania wynosi w przybliżeniu 44 dni. W odniesieniu do *C. dilutus* maksymalne okresy narażenia wynoszą 64 i 65 dni, odpowiednio, dla pierwszego i drugiego pokolenia. Całkowity czas trwania wynosi w przybliżeniu 100 dni.

Projekt ze wzbogaconym osadem: W projekcie ze wzbogaconym osadem narażenie zaczyna się z chwilą dodania larw i wynosi maksymalnie 28 dni dla obu pokoleń *C. riparius* i *C. yoshimatsui* oraz maksymalnie 65 dni dla obu pokoleń *C. dilutus*.

Uwagi

Wylęg

35. Należy określić czas rozwoju i całkowitą liczbę w pełni przepoczwarzonych i żywych samców i samic muchówek dla obu pokoleń. Samce można łatwo zidentyfikować dzięki ich pierzastym czułkom i smukłej budowie ciała.

▼M6

36. Naczynia badawcze zwierające oba pokolenia należy obserwować co najmniej trzy razy w tygodniu w celu wizualnej oceny ewentualnego nietypowego zachowania larw (np. porzucanie osadu, nietypowy sposób pływania) w porównaniu z próbą kontrolną. Podczas okresu wylęgu, który w przypadku *C. riparius* i *C. yoshimatsui* zaczyna się około 12 dni po umieszczeniu larw (20 dni w odniesieniu do *C. dilutus*), wylęgnięte muchówki liczy się i określa się ich płeć co najmniej raz, a najlepiej dwa razy dziennie (wcześnie rano i późnym popołudniem). Po identyfikacji muchówki z pierwszego pokolenia usuwa się ostrożnie z naczyń i przenosi do klatki hodowlanej. Muchówki z drugiego pokolenia usuwa się i uśmierca po zidentyfikowaniu. Wszystkie sznury jaj złożonych w naczyniu badawczym z pierwszym pokoleniem należy osobno zebrać i przenieść wraz z 2,5 ml wody z tego naczynia do 12-dołkowej mikropłytki (lub innego odpowiedniego naczynia), które jest przykrywane pokrywą, aby zapobiec znacznemu parowaniu. Należy także odnotować liczbę martwych larw i widocznych poczwarek, z których nie wylęgły się muchówki. Przykłady klatki hodowlanej, naczynia badawczego i wentylatora wyciągowego podano w dodatku 5.

Rozmnażanie

37. Wpływ na rozrodczość ocenia się na podstawie liczby sznurów jaj złożonych przez pierwsze pokolenie muchówek i płodności tych jaj. Sznury jaj zbiera się raz dziennie z krystalizatora umieszczonego w pojemniku hodowlanym. Sznury jaj złożonych w naczyniu badawczym należy zebrać i przenieść z 2,5 ml wody z tego naczynia do 12-dołkowej mikropłytki (umieszczając po jednym sznurze w każdym dołku) lub innych odpowiednich naczyń, które przykrywa się pokrywą, aby zapobiec znacznemu parowaniu. W odniesieniu do każdego sznura jaj dokumentuje się następujące cechy charakterystyczne: dzień zniesienia, wielkość (typowe, tj. 1,0 ± 0,3 cm lub małe; zwykle ≤ 0,5 cm) i struktura (typowe= w kształcie banana ze spiralnie uformowanym sznurem jaj lub nietypowe, np. z niespiralnym sznurem jaj) oraz płodność (zapłodnione lub niezapłodnione). Zapłodnienie sznura jaj ocenia się w ciągu sześciu dni po ich złożeniu. Sznur jaj uznaje się za zapłodniony, jeżeli z co najmniej jednej trzeciej jaj wylęgają się larwy. Całkowitą liczbę samic umieszczonych w klatce hodowlanej wykorzystuje się do obliczenia liczby sznurów jaj przypadających na samicę i liczbę sznurów zapłodnionych jaj na samicę. Jeżeli jest to konieczne, można oszacować liczbę jaj w sznurze nie niszcząc go dzięki zastosowaniu metody zliczania pierścieni (przedstawionej szczegółowo w pkt 32 i 33).

Pomiary analityczne

Stężenie badanej substancji chemicznej

38. Na początku narażenia i na końcu badania trzeba przeanalizować co najmniej próbki wody nadosadowej, wody porowej i osadu (w przypadku wzbogacenia wody najlepiej godzinę po dodaniu substancji chemicznej) przy najwyższym i przy niższym stężeniu. Dotyczy to naczyń zawierających oba pokolenia. W odniesieniu do krystalizatorów w klatce hodowlanej analizuje się tylko wodę nadosadową, ponieważ z nią stykają się sznury jaj (w przypadku projektu ze wzbogaconym osadem można uwzględnić analityczne potwierdzenie stężenia substancji w osadzie). Dalsze pomiary stężenia substancji badanej w osadzie, wodzie porowej lub warstwie wody nadosadowej można przeprowadzić w trakcie badania, jeżeli uzna się je za konieczne. Takie oznaczenia stężenia badanej substancji chemicznej zapewniają informacje na temat zachowania/rozdziału badanej substancji w układzie woda-osad. Pobieranie próbek osadu i wody porowej na początku i w trakcie badania (zob. pkt 39) wymaga użycia dodatkowych naczyń badawczych w celu wykonania oznaczeń analitycznych. Pomiary stężenia w osadzie w projekcie ze wzbogaconą wodą mogą nie być konieczne, jeżeli rozdział badanej substancji chemicznej między wodę a osad został wyraźnie określony

▼M6

w badaniu wody/osadu w porównywalnych warunkach (np. stosunek osadu do wody, sposób dodania substancji, zawartość węgla organicznego w osadzie) albo jeżeli wykaże się, że mierzone stężenia w warstwie wody nadosadowej utrzymują się w przedziale 80–120 % nominalnych lub zmierzonych stężeń pierwotnych.

39. Gdy dokonuje się pomiarów pośrednich (np. w 7 lub 14 dniu) lub jeśli do analizy potrzeba dużych próbek, których nie można pobrać z naczyń badawczych bez zakłócenia układu badawczego, należy dokonać oznaczeń analitycznych próbek pochodzących z dodatkowych naczyń badawczych przygotowanych w ten sam sposób (zawierających także organizmy użyte do badań), ale nie wykorzystywanych do obserwacji biologicznych.

40. Aby oddzielić wodę porową, zaleca się odwirowanie osadu np. przy 10 000 g w temp. 4 °C przez 30 min. Jeśli jednak badana substancja chemiczna nie ulega adsorpcji na filtrze, dopuszczalna jest też filtracja. W niektórych przypadkach analiza stężeń w wodzie porowej może być niemożliwa do przeprowadzenia ze względu na zbyt małą objętość próbki.

Parametry fizykochemiczne

41. Wartość pH, stężenie rozpuszczonego tlenu w wodzie w naczyniach badawczych oraz temperaturę wody w naczyniach badawczych i krystalizatorach należy mierzyć w odpowiedni sposób (zob. pkt 10). Twardość wody i zawartość amoniaku należy zmierzyć w próbach kontrolnych oraz w jednym naczyniu badawczym i krystalizatorze przy najwyższym stężeniu na początku i na końcu badania.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

42. Celem badania pełnego cyklu życia jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na rozmnażanie oraz tempo rozwoju i całkowitą liczbę w pełni przepoczwarzonych i żywych samców i samic muchówek z dwóch pokoleń. W celu obliczenia tempa wylęgu dane dotyczące osobników męskich i żeńskich powinny zostać połączone. Jeśli nie ma wskazań dotyczących statystycznie istotnych różnic wrażliwości w tempie rozwoju osobników każdej płci, wyniki dotyczące osobników męskich i żeńskich mogą zostać połączone do celów analizy statystycznej.

43. Stężenia efektywne, wyrażone jako stężenia w wodzie nadosadowej (w przypadku wzbogaconej wody) lub w osadzie (w przypadku wzbogaconego osadu), oblicza się zwykle w oparciu o zmierzone stężenia na początku narażenia (zob. pkt 38). W związku z tym w przypadku wzbogaconej wody stężenia mierzone zazwyczaj na początku narażenia w wodzie nadosadowej w naczyniach zwierających oba pokolenia i w krystalizatorach uśrednia się dla każdego zabiegu. W przypadku wzbogaconego osadu stężenia mierzone zwykle na początku narażenia w naczyniach zwierających oba pokolenia (i opcjonalnie w krystalizatorach) uśrednia się dla każdego zabiegu.

44. Aby dokonać oszacowania punktowego, np. EC_x, jako prawdziwe kontrpróby można wykorzystywać dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyń i klatek hodowlanych. Przy obliczaniu przedziału ufności dla EC_x należy uwzględnić zmienność między naczyniami lub należy wykazać, że zmienność ta jest na tyle niewielka, że można ją pominąć. Jeżeli model został dopasowany przy użyciu metody najmniejszych kwadratów, do danych statystycznych dotyczących poszczególnych naczyń należy zastosować przekształcenie, aby poprawić jednorodność wariancji. Wartości EC_x należy jednak obliczać po przekształceniu odpowiedzi z powrotem na wartość pierwotną (31).

▼M6

45. W przypadku gdy analiza statystyczna ma na celu określenie wartości NOEC metodą testowania hipotez, należy uwzględnić zmienność między naczyniami, co gwarantuje zastosowanie analizy wariancji ANOVA (np. procedur testu Williamsa i Dunnetta). Test Williamsa byłby odpowiedni w przypadkach, gdy teoretycznie oczekuje się monotonicznej zależności dawka-odpowiedź, a test Dunnetta – gdy hipoteza dotycząca monotoniczności nie jest spełniona. Ewentualnie w przypadkach, w których występują naruszenia zwykłych założeń analizy wariancji ANOA (31), odpowiednie mogą być bardziej odporne testy (27).

Tempo wylęgu

46. Tempa wylęgu są danymi binarnymi i można je analizować z wykorzystaniem testu Cochrana-Armitage'a stosowanego regresywnie w przypadku gdy oczekuje się monotonicznej zależności dawka-odpowiedź i dane te są zgodne z przewidywaniami. W innym przypadku można zastosować test dokładny Fishera lub test Mantela-Haenszela z wartościami p skorygowanymi metodą Bonferroniego-Holma. Jeśli są dowody na większą zmienność między kontrpróbami w ramach tego samego stężenia niż wskazywałby na to rozkład dwumianowy (co określa się często jako zmienność większą niż zmienność w rozkładzie dwumianowym), wówczas należy zastosować odporny test Cochrana-Armitage'a lub test dokładny Fishera, tak jak proponuje się w pozycji (27) w bibliografii.

Określa się sumę żywych przepoczwarzonych muchówek (samców i samic) na każde naczynie, n_e, i dzieli przez liczbę wprowadzonych larw, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

gdzie:

ER = współczynnik wylęgu

n_e = liczba żywych przepoczwarzonych muchówek na każde naczynie

n_a = liczba wprowadzonych larw na każde naczynie (zwykle 20).

Kiedy wartość n_e jest większa niż n_a (tj. kiedy w niezamierzony sposób wprowadzono większą liczbę larw niż przewidziano), należy wyrównać n_a i n_e.

47. Najwłaściwszą alternatywą w przypadku dużych próbek, w których występuje wariancja większa niż wariancja w rozkładzie dwumianowym, jest traktowanie współczynnika wylęgu jako odpowiedzi ciągłej i stosowanie procedur zgodnych z danymi dotyczącymi współczynnika wylęgu. Uznaje się, że próbka jest duża, gdy zarówno liczba przepoczwarzonych, jak i nieprzepoczwarzonych muchówek, przekracza pięć na każde naczynie stanowiące kontrpróbę.

48. Aby zastosować metody analizy wariancji ANOVA, wartości współczynnika wylęgu należy najpierw przekształcić, stosując przekształcenie pierwiastkowe i arcsin lub przekształcenie Freemana-Tukeya w celu otrzymania przybliżonego rozkładu normalnego i wyrównania wariancji. Przy użyciu częstości bezwzględnych można zastosować test Cochrana-Armitage'a, test dokładny Fishera (z korektą Bonferroniego) lub test Mantela-Haenszela. Przekształcenie pierwiastkowe i arcsin stosuje się, wyznaczając funkcję odwrotną względem sinusa ($\sin^{-1}$) pierwiastka współczynnika wylęgu *ER*.

49. W odniesieniu do współczynników wylęgu wartości EC_x oblicza się stosując analizę regresji (np. analizę probitową, logitową lub analizę Weibulla (28)). Jeśli analiza regresji zawodzi (np. w przypadku gdy występują mniej niż dwie częściowe odpowiedzi), stosuje się inne metody nieparametryczne, takie jak średnia krocząca lub prosta interpolacja.

Tempo rozwoju

50. Średni czas rozwoju to średni okres, jaki mija od wprowadzenia larw (dzień 0 badania) do wylęgu muchówek tworzących kohortę badaną

▼M6

(w celu policzenia rzeczywistego czasu rozwoju należy uwzględnić wiek larw w chwili wprowadzenia). Tempo rozwoju (jednostka: 1/dzień) stanowi odwrotność czasu rozwoju i przedstawia tę część rozwoju larwy, która następuje każdego dnia. Do celów oceny omawianych badań dotyczących toksyczności w osadzie preferowane jest tempo rozwoju, jako że jego wariancja jest mniejsza, jest bardziej jednorodne i bliższe normalnemu rozkładowi w porównaniu z czasem rozwoju. Dlatego silniejsze metody parametryczne badania można stosować raczej w odniesieniu do tempa rozwoju niż do czasu rozwoju. Dla tempa rozwoju jako odpowiedzi ciągłej można oszacować wartości EC_x, stosując analizę regresji (zob. np. (29) (30)). Wartość NOEC dla średniego tempa rozwoju można określić przez zastosowanie metod analizy wariancji ANOVA, np. testu Williamsa lub Dunnetta. W związku z tym, że samce wylęgają się wcześniej niż samice, tj. ich tempo rozwoju jest szybsze, warto obliczyć tempo rozwoju oddzielnie dla każdej płci oprócz tempa dla wszystkich muchówek.

51. Do badań statystycznych przyjmuje się, że liczba muchówek zaobserwowanych w dniu kontroli x przepoczwarzyła się w średniej odstępu czasu między dniem x a dniem x-l (l = odstęp czasu między kontrolami, zwykle 1 dzień). Średnia tempa rozwoju na każde naczynie ($\bar{x}$) liczona jest według następującego wzoru:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

gdzie:

$\bar{x}$: średnia tempa rozwoju na każde naczynie

i: wskaźnik odstępu czasowego między kontrolami

m: maksymalna liczba odstępów czasowych między kontrolami

f_i: liczba muchówek przepoczwarzonych w odstępie czasu między kontrolami i

n_e: całkowita liczba muchówek przepoczwarzonych na koniec doświadczenia (Σf_i)

x_i: tempo rozwoju muchówek przepoczwarzonych między kontrolami i

$$x_i = 1/\text{dzień}_i - \frac{l_i}{2}$$

gdzie:

day_i: dzień kontroli (liczba dni od wprowadzenia larw)

l_i: odstęp czasu między kontrolami i (w dniach, zwykle 1 dzień)

Proporcja płci

52. Proporcje płci są danymi binarnymi i w związku z tym należy je oceniać za pomocą dokładnego testu Fischera lub innych odpowiednich metod. Naturalna proporcja płci w przypadku *C. riparius* wynosi jeden, tj. samce i samice występują tak samo licznie. Dane dotyczące proporcji płci należy traktować identycznie dla obu pokoleń. W związku z tym, że maksymalna liczba muchówek na naczynie (tj. 20) jest zbyt mała, by można było dokonać

▼M6

znaczącej analizy statystycznej, sumuje się całkowitą liczbę w pełni przepoczwarzonych i żywych muchówek każdej płci we wszystkich naczyniach użytych w jednym zabiegu. Te nieprzekształcone dane testuje się w odniesieniu do próby kontrolnej (z rozpuszczalnikiem) lub połączonych danych z prób kontrolnych w tablicy wielodzielczej 2 × 2.

Rozmnażanie

53. Rozmnażanie, podobnie jak potencjał reprodukcyjny, oblicza się jako liczbę sznurów jaj przypadającą na samicę. Konkretnie całkowitą liczbę sznurów jaj złożonych w klatce hodowlanej dzieli się przez całkowitą liczbę żywych i nieuszkodzonych samic dodanych do tej klatki. Wartość NOEC dla potencjału reprodukcyjnego można określić przez zastosowanie metod analizy wariancji ANOVA, np. testu Williamsa lub Dunnetta.

54. Płodność sznurów jaj służy do ilościowego określenia liczby sznurów zapłodnionych jaj na samicę. Całkowitą liczbę sznurów zapłodnionych jaj złożonych w klatce hodowlanej dzieli się przez całkowitą liczbę żywych i nieuszkodzonych samic dodanych do tej klatki. Wartość NOEC dla płodności można określić przez zastosowanie metod analizy wariancji ANOVA, np. testu Williamsa lub Dunnetta.

Sprawozdanie z badania

55. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— cechy fizyczne i, w stosownych przypadkach, właściwości fizykochemiczne (rozpuszczalność w wodzie, prężność par, log K_{ow}, współczynnik podziału w glebie (lub w osadzie, jeśli jest dostępny), stabilność w wodzie itd.);

— tożsamość substancji chemicznej (nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna, wzór strukturalny, numer CAS itp.), w tym czystość i metoda analityczna oznaczania ilościowego badanej substancji chemicznej.

Badany gatunek:

— organizmy użyte do badań: gatunek, nazwa naukowa, źródło organizmów i warunki hodowli;

— informacje dotyczące postępowania z pakietami jaj i larwami;

— informacje dotyczące postępowania z przepoczwarzonymi osobnikami dorosłymi z pierwszego pokolenia za pomocą wentylatora wyciągowego itd. (zob. dodatek 5);

— wiek organizmów użytych do badania z pierwszego i drugiego pokolenia w momencie umieszczenia w naczyniu badawczym.

Warunki badania:

— użyty osad, tj. osad naturalny lub preparowany (sztuczny);

— w odniesieniu do osadu naturalnego – lokalizacja i opis miejsca pobrania próbki osadu, w tym, jeśli to możliwe, historia zanieczyszczeń; charakterystyka osadu: pH, zawartość węgla organicznego, stosunek C/N i granulometria (w stosownych przypadkach);

— w odniesieniu do osadu preparowanego – przygotowanie, składniki i charakterystyka (zawartość węgla organicznego, pH, wilgotność itd. na początku badania);

— przygotowanie wody do badań (jeśli stosowana jest woda regenerowana) i jej charakterystyka (stężenie tlenu, pH, przewodność właściwa, twardość itd. na początku badania);

▼M6

— grubość warstwy osadu i warstwy wody nadosadowej w odniesieniu do naczyń badawczych i krystalizatorów;

— objętość warstwy wody nadosadowej i wody porowej; masa mokrego osadu z wodą porową i bez niej w odniesieniu do naczyń badawczych i krystalizatorów;

— naczynia badawcze (materiał i wielkość);

— krystalizatory (materiał i wielkość);

— klatki hodowlane (materiał i wielkość);

— metody przygotowania roztworów podstawowych i badanych stężeń w odniesieniu do naczyń badawczych i krystalizatorów;

— umieszczenie badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych i krystalizatorach; badane stężenia, liczba kontrprób i rozpuszczalników, jeżeli były potrzebne;

— warunki inkubacji w odniesieniu do naczyń badawczych: temperatura, cykl i natężenie oświetlenia, napowietrzanie (pęcherzyki powietrza na sekundę);

— warunki inkubacji w odniesieniu do klatek hodowlanych i krystalizatorów: temperatura, cykl i natężenie oświetlenia;

— warunki inkubacji w odniesieniu do sznurów jaj na mikropłytkach (lub w innych naczyniach): temperatura, cykl i natężenie oświetlenia:

— szczegółowe informacje o żywieniu, w tym rodzaj pokarmu, przygotowanie, schemat żywienia i ilość pokarmu.

Wyniki:

— nominalne badane stężenia, zmierzone badane stężenia i wyniki wszystkich analiz ustalających stężenie badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych i krystalizatorach;

— jakość wody w naczyniach badawczych i krystalizatorach, tj. pH, temperatura, rozpuszczony tlen, twardość i zawartość amoniaku;

— uzupełnienie wyparowanej wody do badań, jeśli miało miejsce;

— liczba przepoczwarzonych samców i samic muchówek na każde naczynie na każdy dzień w pierwszym i drugim pokoleniu;

— stosunek płci w pełni przepoczwarzonych i żywych muchówek na zabieg w pierwszym i drugim pokoleniu;

— liczba nieprzepoczwarzonych larw, na każde naczynie w pierwszym i drugim pokoleniu;

— odsetek wylęgu na każdą kontrpróbę na każde badane stężenie (samice i samce muchówek łącznie) w pierwszym i drugim pokoleniu;

— średnie tempo rozwoju w pełni przepoczwarzonych i żywych muchówek na każdą kontrpróbę oraz zabieg (samice i samce muchówek oddzielnie i łącznie) w pierwszym i drugim pokoleniu;

— liczba sznurów jaj złożonych w krystalizatorach na klatkę hodowlaną na dzień;

▼**M6**

— charakterystyka każdego sznura jaj (wielkość, kształt i płodność);

— potencjał reprodukcyjny – całkowita liczba sznurów jaj na całkowitą liczbę samic dodanych do klatki hodowlanej;

— płodność – całkowita liczba sznurów zapłodnionych jaj przypadająca na całkowitą liczbę samic dodanych do klatki hodowlanej;

— oszacowania toksycznych punktów końcowych, np. EC_x (i powiązane przedziały ufności), wartość stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) i metody statystyczne użyte do ich określenia;

— omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

(1) Rozdział C.28 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności w układzie osad-woda na ochotkowatych z wykorzystaniem wzbogaconej wody.

(2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. i 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. Sprawozdanie końcowe dla Komisji Europejskiej. Nr sprawozdania: EC 3738. Sierpień 1994 r. WRc, Zjednoczone Królestwo.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, warsztaty WOSTA w Holandii.

(5) ASTM International (2009) E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. W: Annual Book of ASTM Standards, tom 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, grudzień 1997.

(7) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Wydanie 2. EPA 600/R-99/064, marzec 2000 r. Zmiana wydania 1 z czerwca 1994 r.

(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*), sprawozdanie techniczne, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Kanada.

(11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. i 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. i 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) Rozdział C.27 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności w układzie osad-woda na ochotkowatych z wykorzystaniem wzbogaconego osadu.

(16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Seria dotycząca badań i oceny, nr 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paryż.

(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, sprawozdanie EPS 1/RM/30, wrzesień 1995 r.

(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. i J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163-1175.

(21) Naylor, C. i 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. i 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. i 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. i 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*, Seria OECD w sprawie badań i oceny Nr 54, 146 s., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paryż.

(32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. i 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. i 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*, publikacja w przygotowaniu, Seria dotyczaca badań i oceny, OECD, Paryż.

▼**M6**

Dodatek 1

Definicje

Do celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Osad preparowany lub odtworzony, sztuczny lub syntetyczny stanowi mieszaninę materiałów używaną do symulowania fizycznych składników naturalnego osadu.

Woda nadosadowa to woda, którą zalano osad w naczyniu badawczym.

Woda porowa to woda wypełniająca przestrzeń między cząstkami osadu i gleby.

Woda wzbogacona to woda do badań, do której dodano badaną substancję chemiczną.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

▼M6

Dodatek 2

Zalecenia dotyczące hodowli *Chironomus riparius*

1. Larwy ochotki (*Chironomus*) można hodować w krystalizatorach lub większych pojemnikach. Na dnie pojemnika rozprowadza się drobny piasek kwarcowy, tworząc cienką warstwę o grubości 5–10 mm. Odpowiednim substratem okazała się także ziemia okrzemkowa (np. Merck, Art 8117) (wystarczająca jest cieńsza warstwa grubości najwyżej kilku milimetrów). Następnie dodaje się odpowiednią wodę na wysokość kilku centymetrów. Poziomy wody należy uzupełniać, aby wyrównać stratę spowodowaną parowaniem i zapobiec wysychaniu. Wodę w razie konieczności można wymieniać. Należy zapewnić delikatne napowietrzanie. Naczynia do chowu larw należy przechowywać w odpowiedniej klatce, aby zapobiec ucieczce przepoczwarzonych osobników dorosłych. Klatka powinna być na tyle duża, by umożliwić rojenie przepoczwarzonych osobników dorosłych, w przeciwnym razie może nie dojść do kopulacji (co najmniej ok. 30 × 30 × 30 cm).

2. Klatki powinny być trzymane w temperaturze pokojowej lub w pomieszczeniu o stałych warunkach środowiska w temperaturze 20 ± 2 C z fotoperiodem wynoszącym 16 godzin światła (o natężeniu ok. 1 000 luksów) i 8 godzin ciemności. Odnotowywano, że wilgotność powietrza mniejsza niż 60 % wilgotności względnej może utrudniać rozmnażanie.

Woda rozcieńczająca

3. Można stosować każdy rodzaj wody naturalnej lub syntetycznej. Powszechnie stosowana jest woda studzienna, odchlorowana woda wodociągowa i sztuczne roztwory (np. Elendta „M4” lub „M7”, zob. również poniżej). Woda przed użyciem powinna być napowietrzona. W miarę potrzeby woda do hodowli może być wymieniana przez ostrożne odlewanie lub syfonowanie zużytej wody z naczyń hodowlanych bez niszczenia rurek larw.

Karmienie larw

4. Larwom *Chironomus* należy podawać pokarm w płatkach dla ryb (Tetra Min®, Tetra Phyll® lub innej marki pokarm dla ryb) w ilości ok. 250 mg na każde naczynie dziennie. Można podawać pokarm w postaci suchego mielonego proszku lub zawiesiny w wodzie: 1,0 g pokarmu w płatkach dodaje się do 20 ml wody rozcieńczającej i rozdrabnia się w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny. Preparat taki można stosować jako pokarm w ilości ok. 5 ml na każde naczynie na dzień (przed użyciem wstrząsnąć). Starsze larwy mogą dostawać go więcej.

5. Żywienie dostosowuje się do jakości wody. Jeśli podłoże hodowlane staje się mętne, należy ograniczyć karmienie. Podawanie pokarmu należy starannie monitorować. Zbyt mała ilość pokarmu spowoduje migrację larw w kierunku warstwy wody, a zbyt duża wywoła zwiększoną aktywność mikroorganizmów i zmniejszone stężenie tlenu. Oba rodzaje warunków mogą spowodować ograniczenie tempa wzrostu.

6. Przygotowując nowe naczyń do hodowli, można też dodać komórki niektórych gatunków zielenic (np. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Karmienie przepoczwarzonych osobników dorosłych

7. Niektórzy badacze sugerują, by do karmienia przepoczwarzonych osobników dorosłych używać tamponu z wełny bawełnianej nasączonego nasyconym roztworem sacharozy.

▼M6

Wylęg

8. Przy temperaturze 20 ± 2 °C po ok. 13–15 dniach w naczyniach do hodowli larw uwalniają się z poczwarek osobniki dorosłe. Samce łatwo zidentyfikować dzięki pierzastym czułkom i smukłej budowie ciała.

Pakiety jaj

9. Z chwilą pojawienia się w klatce hodowlanej osobników dorosłych należy trzy razy w tygodniu sprawdzać we wszystkich naczyniach do chowu larw, czy nie zostały złożone galaretowate pakiety jaj. Jeśli zostały złożone, należy je ostrożnie usunąć. Należy przenieść je do niewielkiego naczynia zawierającego próbkę wody używanej do hodowli. Pakiety jaj wykorzystuje się do zapoczątkowania hodowli w nowym naczyniu (np. 2–4 pakietów jaj na naczynie) lub do badań toksyczności.

10. Larwy w pierwszym stadium larwalnym powinny wylęgnąć się po 2–3 dniach.

Przygotowanie hodowli w nowych naczyniach

11. Po założeniu hodowli powinno być możliwe założenie nowego naczynia z nową hodowlą larw raz na tydzień lub rzadziej, w zależności od wymogów badania, przy czym usuwa się starsze naczynia po pojawieniu się w nich dorosłych muchówek. Stosując ten system, uzyskuje się stałe źródło zaopatrzenia w dorosłe osobniki przy zminimalizowaniu zarządzania.

Przygotowanie roztworów do badań „M4” i „M7”

12. Roztwór „M4” został opisany przez Elendta (1990). Roztwór „M7” przygotowuje się jak roztwór „M4” z wyjątkiem substancji wskazanych w tabeli 1, których stężenie w „M7” jest czterokrotnie mniejsze niż w „M4”. Roztwór do badań nie powinien być przygotowywany zgodnie z instrukcjami Elendta i Biasa (1990), ponieważ stężenia $NaSiO_3 \cdot 5\ H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 i K_2HPO_4 podane dla przygotowania roztworów podstawowych nie są odpowiednie.

Przygotowanie roztworu „M7”

13. Każdy roztwór podstawowy (I) przygotowuje się oddzielnie, a z roztworów podstawowych (I) przygotowuje się łączony roztwór podstawowy (II) (zob. tabela 1). W celu przygotowania roztworu „M7” 50 ml połączonego roztworu podstawowego (II) oraz podane w tabeli 2 ilości każdego roztworu podstawowego makroskładnika odżywczego dopełnia się do 1 litra wodą dejonizowaną. Roztwór podstawowy witamin przygotowuje się przez dodanie trzech witamin do wody dejonizowanej, jak wskazano w tabeli 3, a do końcowego roztworu „M7” na krótko przed użyciem dodaje się 0,1 ml łączonego roztworu podstawowego witamin. Roztwór podstawowy witamin przechowuje się zamrożony w małych podwielokrotnościach. Roztwór jest napowietrzany i stabilizowany.

Tabela 1

Roztwory podstawowe pierwiastków śladowych w odniesieniu do roztworów M4 i M7

Roztwory podstawowe (I)	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną	W celu przygotowania łączonego roztworu podstawowego (II): zmieszać następujące ilości (ml) roztworów podstawowych (I) i dopełnić do 1 litra wodą dejonizowaną		Końcowe stężenia w roztworach do badań (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**

Roztwory podstawowe (I)	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną	W celu przygotowania łączonego roztworu podstawowego (II): zmieszać następujące ilości (ml) roztworów podstawowych (I) i dopełnić do 1 litra wodą dejonizowaną		Końcowe stężenia w roztworach do badań (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	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Substancje te różnią się w odniesieniu do M4 i M7, jak określono powyżej.
(2) Roztwory te są przygotowywane oddzielnie, następnie łączone ze sobą i niezwłocznie poddawane sterylizacji w autoklawie.

Tabela 2

Roztwory podstawowe makroskładników odżywczych w odniesieniu do roztworów M4 i M7

	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną (mg)	Ilość roztworów podstawowych makroskładników odżywczych w celu przygotowania roztworów M4 i M7 (ml/l)	Końcowe stężenia w roztworach do badań 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**

Tabela 3

Roztwór podstawowy witamin dla roztworów M4 i M7

Wszystkie trzy roztwory witamin łączy się, by otrzymać jeden roztwór podstawowy witamin.

	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną (mg)	Ilość (ml/l) roztworu podstawowego witamin dodawanego w celu przygotowania roztworów M4 i M7 (ml/l)	Końcowe stężenia w roztworach do badań M4 i M7 (mg/l)
Chlorowodorek tiaminy	750	0,1	0,075
Cyjanokobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotyna	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAFIA

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, M. Streloke i H. Köpp (red.), Berlin. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25-33.

Elendt, B.P. i 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

Dodatek 3

Przygotowanie osadu preparowanego

SKŁAD OSADU

Skład osadu preparowanego powinien być następujący:

Składnik	Właściwości	% suchej masy osadu
Torf	Torf sfagnowy, w miarę możliwości o wartości pH równej 5,5–6,0, bez widocznych pozostałości roślin, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 1 mm), suszony powietrzem	4 – 5
Piasek kwarcowy	Wielkość ziaren: > 50 % cząstek powinna mieścić się w przedziale 50–200 μm	75 – 76
Glinka kaolinowa	Zawartość kaolinitu ≥ 30 %	20
Węgiel organiczny	Korygowany przez dodanie torfu i piasku	2 (± 0,5)
Węglan wapnia	$CaCO_3$, sproszkowany, czysty chemicznie	0,05 – 0,1
Woda	Przewodność właściwa ≤ 10 μS/cm	30 – 50

PRZYGOTOWANIE

Torf suszy się powietrzem i mieli na drobny proszek. Zawiesinę wymaganej ilości proszku torfowego w wodzie dejonizowanej przygotowuje się z użyciem wysokosprawnego urządzenia do homogenizacji. Wartość pH zawiesiny koryguje się do poziomu 5,5 ± 0,5, stosując $CaCO_3$. W celu ustabilizowania pH i komponentu mikrobiologicznego zawiesinę kondycjonuje się przez co najmniej dwa dni w temperaturze 20 ± 2 °C, delikatnie mieszając. Ponownie mierzy się pH, którego wartość powinna wynosić 6,0 ± 0,5. Następnie zawiesinę torfową miesza się z innymi składnikami (piaskiem i glinką kaolinową) oraz wodą dejonizowaną, aby otrzymać jednorodny o zawartościi wody w przedziale 30–50 % suchej masy osadu. Ponownie mierzy się wartość pH końcowej mieszaniny i koryguje w miarę potrzeby za pomocą $CaCO_3$ do poziomu 6,5 – 7,5. Próbki osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość węgla organicznego. Następnie, przed ich wykorzystaniem w badaniu toksyczności na ochotkowatych, zaleca się kondycjonowanie osadu preparowanego przez siedem dni w tych samych warunkach, w jakich zostanie przeprowadzone badanie.

PRZECHOWYWANIE

Suche składniki do przygotowywania sztucznego osadu mogą być przechowywane w suchym i chłodnym miejscu w temperaturze pokojowej. Nie należy przechowywać (mokrego) osadu preparowanego przed jego użyciem do badania. Osad należy wykorzystać natychmiast po 7-dniowym okresie kondycjonowania, kończącym proces jego przygotowania.

BIBLIOGRAFIA

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, wytyczna nr 207 w sprawie badań, Wytyczne dotyczące badania substancji chemicznych, OECD, Paryż.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. i 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**

Dodatek 4

Właściwości chemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej

SKŁADNIK	STĘŻENIA
Cząstki stałe	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 mg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 µg/l
Twardość wyrażona jako $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Chlor resztkowy	< 10 µg/l
Pestycydy fosforoorganiczne ogółem	< 50 ng/l
Pestycydy chloroorganiczne ogółem plus polichlorowane bifenyle	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l

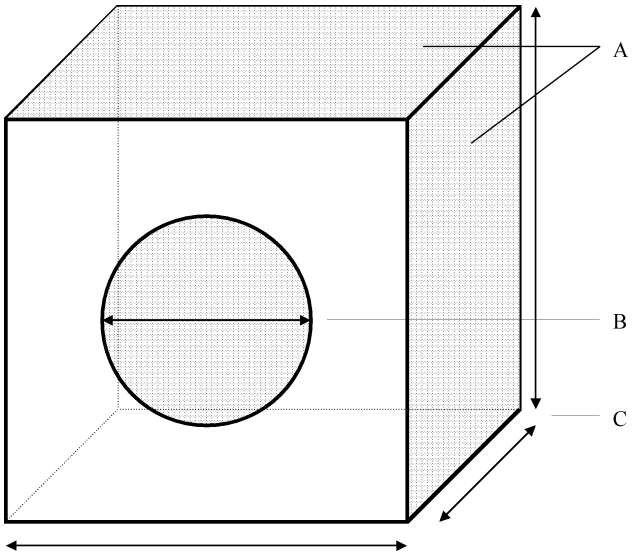
(*) Jeśli jednak zachodzi podejrzenie interakcji między jonami powodującymi twardość wody a badaną substancją chemiczną, należy stosować wodę o mniejszej twardości (w takim przypadku nie należy zatem stosować roztworu Elendta M4).

▼**M6**

Dodatek 5

Wytyczne dotyczące przeprowadzania badania

Przykład klatki hodowlanej:



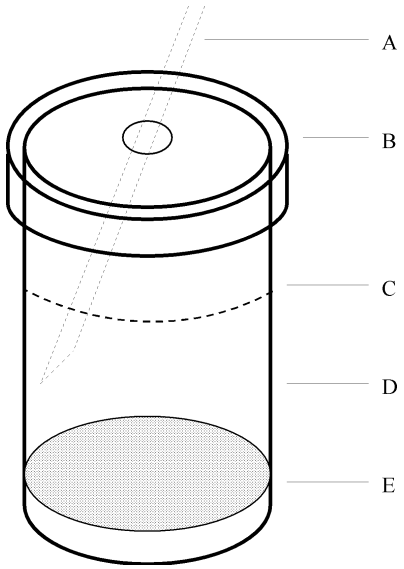
A: siatka na górnej części i co najmniej na jednej ścianie klatki (wielkość oczek ok. 1 mm)

B: otwór do umieszczania przepoczwarzonych osobników dorosłych wewnątrz klatki hodowlanej i usuwania złożonych sznurów jaj z krystalizatorów (nie przedstawionych na rysunku)

C: minimalne wymiary klatki hodowlanej: długość 30 cm, wysokość 30 cm, szerokość 30 cm

▼**M6**

Przykład naczynia badawczego:



A: pipeta Pasteura jako doprowadzenie powietrza do warstwy wody nadosadowej

B: szklana pokrywa zapobiegająca ucieczce muchówek

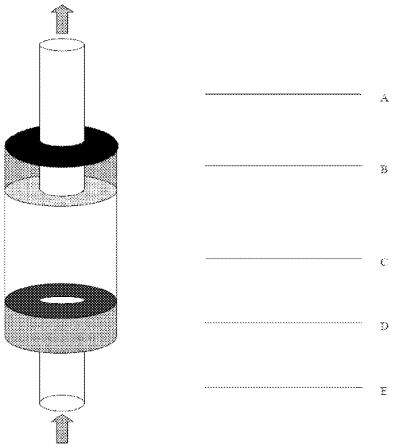
C: warstwa powierzchniowa wody

D: naczynie badawcze (szklana zlewka o pojemności min. 600 ml)

E: warstwa osadu

▼**M6**

Przykład wentylatora wyciągowego d pozyskiwania dorosłych muchówek (strzałki wskazują kierunek przepływu powietrza):



A: rurka szklana (średnica wewnętrzna ok. 5 mm) połączona z pompą samozasysającą

B: korek z gumy z otworem na szklaną rurkę (A). Po stronie wewnętrznej, otwór szklanej rurki (A) jest zakryty bawełną i siatką (wielkość oczek ok. 1 mm), aby zapobiec uszkodzeniu muchówek podczas ich zasysania do wentylatora wyciągowego.

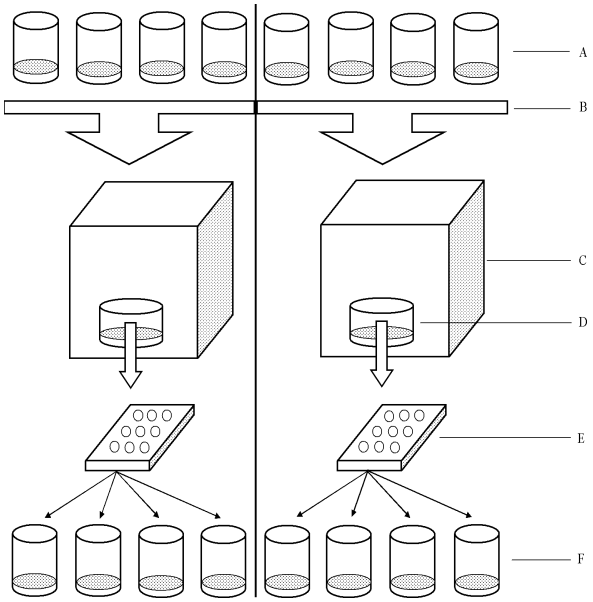
C: przezroczysty pojemnik (z tworzywa sztucznego lub szkła, długość ok. 15 cm) na schwytane muchówki

D: korek z gumy z otworem na rurkę (E). Aby wprowadzić muchówki do klatki hodowlanej, należy wyjąć korek D z pojemnika C.

E: rurka (z tworzywa sztucznego lub szkła, średnica wewnętrzna ok. 8 mm) do zbierania schwytanych muchówek z naczynia

▼**M6**

Schematyczna prezentacja badania cyklu życia



A: 1. pokolenie – naczynia badawcze z układem osad-woda, osiem kontrprób, 20 larw w pierwszym stadium larwalnym na naczynie

B: cztery naczynia badawcze na każdą klatkę hodowlaną, A i B

C: klatki hodowlane (A i B) do rojenia, godów i składania jaj

D: krystalizatory do umieszczania sznurów jaj

E: mikropłytki, jeden dołek na każdy sznur jaj

F: 2. pokolenie – naczynia badawcze z układem osad-woda, osiem kontrprób, 20 larw w pierwszym stadium larwalnym na naczynie.

▼M6

C.41. BADANIE ROZWOJU PŁCIOWEGO RYB

WPROWADZENIE

1. Opisywana metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 234 (2011 r.) w sprawie badań. Jej podstawą jest decyzja z 1998 r. mająca na celu opracowanie nowych lub aktualizację istniejących metod badawczych na potrzeby przeglądu i badania substancji potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Badanie rozwoju płciowego ryb zidentyfikowano jako obiecującą metodę badawczą, obejmującą wrażliwy etap życia ryb, na którym reagują na substancje chemiczne o charakterze zbliżonym zarówno do estrogenów, jak i androgenów. Wspomniana metoda badawcza przeszła proces weryfikacji międzylaboratoryjnej w latach 2006–2010, w ramach której sprawdzono ryżankę japońską (*Oryzias latipes*), danio pręgowanego (*Danio rerio*) i ciernika (*Gasterosteus aculeatus*), a *Pimephales promelas* zweryfikowano częściowo (41) (42) (43). Niniejszy protokół dotyczy ryżanki japońskiej, ciernika i danio pręgowanego. Zasadniczo protokół ten stanowi rozszerzenie wytycznej OECD nr 210 w sprawie badań „Badanie toksyczności ryb na wczesnym etapie życia" (*Fish Early Life Stage Toxicity Test*) (1), przy czym narażenie kontynuuje się do momentu zróżnicowania ryb pod względem płci, tj. około 60 dni po wykluciu w przypadku ryżanki japońskiej, ciernika i danio pręgowanego (okres narażenia może być krótszy lub dłuższy w przypadku innych gatunków, które zostaną zweryfikowane w przyszłości), i dodaje się punkty końcowe określające wrażliwość układu hormonalnego. W badaniu rozwoju płciowego ryb ocenia się wpływ i potencjalne niekorzystne skutki substancji chemicznych przypuszczalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (np. estrogenów, androgenów i inhibitorów steroidogenezy) dla rozwoju płciowego ryb na wczesnym etapie ich życia. Dzięki połączeniu dwóch podstawowych punktów końcowych określających wpływ na układ hormonalny, stężenia witellogeniny (VTG) i fenotypowej proporcji płci badanie umożliwia pokazanie sposobu działania badanej substancji chemicznej. Ze względu na zmianę fenotypowej proporcji płci istotną dla danej populacji badanie rozwoju płciowego ryb można wykorzystać do oceny zagrożenia i ryzyka. Jeżeli badanie stosuje się w celu oceny zagrożenia i ryzyka, nie należy wykorzystywać w nim ciernika, ponieważ dostępne do chwili obecnej dane weryfikacyjne wykazały, że w przypadku tego gatunku zmiany w fenotypowej proporcji płci wywołane przez badane substancje chemiczne występowały rzadko.

2. Protokół opiera się na badaniu ryb narażonych przez wodę na działanie substancji chemicznych podczas nietrwałego okresu płciowego, w którym oczekuje się, że ryby będą najbardziej wrażliwe na wpływ substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Dokonuje się pomiaru dwóch podstawowych punktów końcowych będących wskaźnikami aberracji rozwojowych związanych z układem hormonalnym, stężeń VTG i proporcji płci (proporcji między płciami) określonych na podstawie histologii gonad. Histopatologia gonad (ocena i określenie etapów rozwoju oocytów i komórek spermatogenetycznych) nie jest obowiązkowa. Dodatkowo określa się w miarę możliwości płeć genetyczną (np. w przypadku ryżanki japońskiej i ciernika). Obecność markera płci genetycznej stanowi znaczną zaletę, ponieważ zwiększa moc statystyk dotyczących proporcji płci i umożliwia wykrycie odwrócenia płci fenotypowej. Inne szczytowe punkty końcowe, które należy zmierzyć, obejmują wskaźnik wylęgalności, przeżywalność, długość i masę ciała. Niniejszą metodę badawczą można dostosować do gatunków innych niż wspomniane powyżej, pod warunkiem że: (i) te inne gatunki zostaną poddane walidacji równorzędnej weryfikacji przeprowadzonej w przypadku ryżanki japońskiej, ciernika i danio pręgowanego; (ii) próba kontrolna ryb jest zróżnicowana pod względem płci pod koniec badania; (iii) poziomy VTG są na tyle wysokie, że umożliwiają wykrycie zmian związanych z substancją chemiczną; oraz (iv) wrażliwość układu badawczego określa się, stosując substancje chemiczne odniesienia zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego ((anty)estrogeny, (anty)angrogeny, inhibitory aromatazy itd.). Ponadto każde sprawozdanie z weryfikacji odnoszące się do badania rozwoju płciowego ryb powinno zostać ocenione przez OECD, a wyniki weryfikacji powinny zostać uznane za satysfakcjonujące.

▼M6

Uwagi wstępne i ograniczenia

3. VTG jest prawidłowo wytwarzana w wątrobie jajorodnych samic kręgowców w reakcji na endogenny estrogen w układzie krążenia (2). Jest ona prekursorem białek żółtka i po wytworzeniu w wątrobie jest przenoszona przez krew do jajnika, gdzie jest pobierana i modyfikowana przez rozwijające się komórki jajowe. Synteza VTG jest bardzo ograniczona, choć wykrywalna, u niedojrzałych płciowo ryb i dorosłych samców ryb, ponieważ nie mają wystarczającej ilości estrogenu w układzie krążenia. Wątroba ma jednak zdolność syntezy i wydzielania VTG w reakcji na egzogenną stymulację estrogenem (3) (4) (5).

4. Pomiar VTG służy wykrywaniu substancji chemicznych o estrogennym, antyestrogennym i androgennym charakterze działania oraz substancji chemicznych, które interferuja ze steroidogenezą, na przykład inhibitorów aromatazy. Wykrycie estrogennych substancji chemicznych jest możliwe dzięki pomiarowi indukcji VTG u samców ryb i zostało bogato udokumentowane w recenzowanej literaturze naukowej. Indukcję VTG wykazano również po narażeniu na aromatyzowalne androgeny (6) (7). Obniżenie poziomu estrogenu w układzie krążenia w przypadku samic, na przykład na skutek zahamowania aktywności aromatazy przekształcającej endogenny androgen w naturalny estrogen 17β-estradiol, powoduje zmniejszenie stężenia VTG, co wykorzystuje się do wykrywania substancji chemicznych działających jak inhibitory aromatazy lub, ogólniej, do wykrywania inhibitorów steroidogenezy (33). Biologiczne znaczenie reakcji VTG po zahamowania aktywności substancji estrogennej/aromatazy zostało ustalone i jest szeroko udokumentowane (8) (9). Możliwe jest jednak, że na wytwarzanie VTG u samic może również wpływać ogólna toksyczność i niehormonalne sposoby działania toksycznego.

5. Opracowano i znormalizowano z dobrym wynikiem kilka metod pomiaru w celu rutynowego wykorzystywania do ilościowego oznaczania VTG w próbkach krwi, wątroby, całego ciała lub homogenatów głowy/ogona pobranych od pojedynczych ryb. Dotyczy to danio pręgowanego, ciernika i ryżanki japońskiej oraz częściowo zweryfikowanego gatunku *Pimephales promelas*; dostępne są metody oparte na właściwym dla danego gatunku teście immunenzymatycznym (ELISA), w których do oznaczenia ilościowego VTG wykorzystuje się metody immunochemiczne (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). W przypadku ryżanki japońskiej i danio pręgowanego występuje dobra korelacja między VTG mierzoną w próbkach osocza krwi, wątroby i homogenatów, mimo że homogenaty zwykle wykazują nieco niższe wartości niż osocze (17) (18) (19). W dodatku 5 przedstawiono zalecane procedury pobierania próbek do celów analizy VTG.

6. Zmiana w fenotypowej proporcji płci stanowi parametr docelowy odzwierciedlający odwrócenie płci. W zasadzie estrogeny, antyestrogeny, androgeny, antyandrogeny i substancje chemiczne hamujące steroidogenezę mogą mieć wpływ na proporcję płci rozwijających się ryb (20). Wykazano, że odwrócenie płci jest częściowo odwracalne w przypadku danio pręgowanego (21) po narażeniu na działanie substancji chemicznej podobnej do estrogenu, natomiast odwrócenie płci po narażeniu na działanie substancji chemicznej podobnej do androgenu jest trwałe (30). Płeć definiuje się jako żeńską, męską, interseksualną (w jednej gonadzie znajdują się zarówno oocyty, jak i komórki spermatogenezy) lub niezróżnicowaną; u pojedynczych osobników określa się ją na podstawie histologicznego badania gonad. Wytyczne zostały zamieszczone w dodatku 7 i wytycznej OECD dotyczącej diagnozy histopatologii gonad ryb powiązanej z układem hormonalnym (*Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads*) (22).

7. Płeć genetyczną bada się za pośrednictwem markerów genetycznych, jeżeli występują one u danego gatunku ryb. W przypadku ryżanki japońskiej geny żeńskie XX lub męskie XY można wykryć za pomocą łańcuchowej

▼M6

reakcji polimerazy (PCR) lub analizy związanej z genem Y zawierającym domenę DM (DMY) zgodnie z opisem w (23) (24) (DMY negatywny lub pozytywny). W przypadku ciernika istnieje równoważna metoda PCR określania płci genetycznej, którą opisano w dodatku 10. W przypadku gdy płeć genetyczną można połączyć indywidualnie z płcią fenotypową, moc badania zwiększa się i w związku z tym płeć genetyczną należy określać u gatunków o udokumentowanych markerach płci genetycznej.

8. Dwa podstawowe punkty końcowe wpływające na układ hormonalny, VTG i proporcja płci, mogą łącznie wskazywać na hormonalny charakter działania substancji chemicznej (zob. tabela 1). Proporcja płci stanowi biomarker istotny dla populacji (25) (26), a w przypadku dobrze znanego charakteru działania niektórych substancji wyniki badania rozwoju płciowego ryb można wykorzystać do oceny zagrożenia i ryzyka, jeżeli organ regulacyjny uzna to za właściwe. Taki charakter działania mają obecnie estrogeny, androgeny i inhibitory steroidogenezy.

Tabela 1

Reakcja punktów końcowych wpływających na układ hormonalny na różne charaktery działania substancji chemicznych.

↑ = podwyższenie, ↓ = obniżenie, — = nie zbadano

CHARAKTER DZIAŁANIA	VTG ♂	VTG ♀	Proporcja płci	Bibliografia
Słaby agonista estrogenu	↑	↑	↑♀ lub ↑Niezróżn.	(27) (40)
Silny agonista estrogenu	↑	↑	↑♀ lub ↑Nieróżn., Brak ♂	(28) (40)
Antagonista estrogenu	—	—	↓♀, ↑Niezróżn.	(29)
Agonista androgenu	↓ lub —	↓ lub —	↑ ♂, Brak ♀	(28) (30)
Agonista androgenu	—	—	↑♀ ↑Interseks.	(31)
Inhibitor aromatazy	↓	↓	↓♀	(33)

9. Badanie rozwoju płciowego ryb nie obejmuje fazy rozmnażania ryb, w związku z czym substancje chemiczne, co do których zachodzi podejrzenie, że mają wpływ na rozmnażanie przy stężeniach niższych niż stężenia wpływające na rozwój płciowy, należy poddać badaniu, które obejmuje rozmnażanie.

10. Definicje dla potrzeb niniejszej metody badawczej przedstawiono w dodatku 1.

11. Badanie rozwoju płciowego ryb *in vivo* ma na celu wykrycie substancji chemicznych o właściwościach androgennych i estrogennych, jak również antyandrogennych, antyestrogennych i hamujących steroidogenezę. Etapy weryfikacji w badaniu rozwoju płciowego ryb (1 i 2) faktycznie obejmowały substancje chemiczne estrogenne, androgenne i hamujące steroidogenezę. Oddziaływania antagonistów estrogenu i androgenu na rozwój płciowy ryb przedstawiono w tabeli 1, jednak te charaktery działania są obecnie w mniejszym stopniu udokumentowane.

ZASADA BADANIA

12. Badanie polega na narażaniu ryb od zapłodnionej komórki jajowej do zakończenia różnicowania płci na co najmniej trzy stężenia badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w wodzie. Badanie powinno się wykonywać w warunkach przepływu, chyba że jest to niemożliwe ze względu na dostępność lub charakter (np. ograniczoną rozpuszczalność) badanej substancji chemicznej. Badanie zaczyna się od umieszczenia świeżo zapłodnionych komórek jajowych (przed bruzdkowaniem tarczy zarodkowej) w komorach

▼M6

badawczych. Obciążenie komór opisano w pkt 27 w odniesieniu do każdego gatunku. W przypadku zweryfikowanych gatunków ryb, t.j. ryżanki japońskiej, ciernika i danio pręgowanego, badanie kończy się 60 dni po wykluciu. Na zakończenie badania wszystkie ryby poddaje się eutanazji w sposób humanitarny. Z każdej ryby pobiera się próbki biologiczne (osocza krwi, wątroby lub homogenatu głowy/ogona) do analizy stężenia witellogeniny (VTG), pozostałą część utrwala się natomiast w celu wykonania oceny histologicznej gonad i określenia płci fenotypowej; nieobowiązkowo można przeprowadzić histopatologię (np. określenie etapu rozwoju gonad, intensywność interseksualności). Biologiczną próbkę (płetwę odbytową lub grzbietową) na potrzeby określenia płci genetycznej pobiera się od gatunków posiadających odpowiednie markery (dodatki 9 i 10).

13. Przegląd właściwych warunków badania specyficznych dla zweryfikowanych gatunków, t.j. ryżanki japońskiej, ciernika i danio pręgowanego, podano w dodatku 2.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

14. Powinny być dostępne wyniki badania toksyczności ostrej lub innego krótkoterminowego badania toksyczności (np. metodą badania C.14 (34) w oparciu o wytyczną OECD 210 w sprawie badań (1)), najlepiej przeprowadzonego na gatunkach wybranych do tego badania. Oznacza to, że rozpuszczalność w wodzie i prężność par badanej substancji chemicznej powinny być znane, jak również powinna być dostępna niezawodna analityczna metoda oznaczania ilościowego substancji w komorach badawczych o udokumentowanej dokładności i granicy wykrywalności.

15. Inne użyteczne informacje obejmują wzór strukturalny, czystość substancji, stabilność w wodzie i pod wpływem światła, stałą dysocjacji, współczynnik podziału n-oktanol/woda oraz wyniki badania szybkiej biodegradadowalności (zob. metoda badania C.4) (35).

Kryteria akceptacji badania

16. Aby wyniki badania były akceptowalne, muszą zostać spełnione następujące warunki:

— stężenie tlenu rozpuszczonego musi wynosić co najmniej 60 % wartości nasycenia powietrzem (ASV) w trakcie badania;

— różnica temperatury wody między komorami badawczymi przez cały czas trwania badania nie może być większa niż ± 1,5 °C i musi być utrzymywana w zakresie temperatur określonym w odniesieniu do gatunków badanych (dodatek 2);

— powinna być dostępna zweryfikowana metoda analizy narażenia na działanie substancji chemicznej, której granica wykrywalności znajduje się znacznie poniżej najniższego nominalnego stężenia; należy również zebrać dowody, aby wykazać, że stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze można było utrzymać w granicach ± 20 % średnich zmierzonych wartości;

— ogólna liczba zapłodnionych komórek jajowych, które przeżyły w próbach kontrolnych i, w uzasadnionych przypadkach, w próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem, powinna być większa niż wartości graniczne określone w dodatku 2 lub im równa;

— kryteria akceptacji związane z wzrostem i proporcjami płci na zakończenie badania są oparte na danych z grup kontrolnych (połączonych prób kontrolnych z rozpuszczalnikiem i wodą lub, jeśli znacznie się różnią, tylko z rozpuszczalnikiem):

▼M6

		Ryżanka japońska	Danio pręgowany	Ciernik
Wzrost	Mokra masa ryb osuszonych na bibule	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Długość (długość standardowa)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Proporcja płci (% samców i samic)		30-70 %	30-70 %	30-70 %

— W przypadku stosowania rozpuszczalnika nie powinien on mieć istotnego statystycznie wpływu na przeżywalność i nie powinien zaburzać równowagi układu hormonalnego lub wykazywać innych szkodliwych skutków na wczesnych etapach życia, jak wykazano w próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem.

Jeżeli zaobserwuje się odchylenie od kryteriów akceptacji badania, skutki należy zanalizować w odniesieniu do wiarygodności danych badania, a analizy te należy uwzględnić w sprawozdaniu.

OPIS METODY BADAWCZEJ

Komory badawcze

17. Można użyć komór wykonanych ze szkła, stali nierdzewnej lub innych obojętnych chemicznie materiałów. Wymiary komór muszą być na tyle duże, aby zapewnić zgodność z podanymi poniżej kryteriami wskaźnika obciążenia. Zaleca się losowe rozmieszczenie komór badawczych w obszarze badania. Projekt z blokowym układem losowym, przy czym w każdym bloku występuje każde stężenie, jest korzystniejszy niż całkowicie losowy układ. Komory badawcze powinny być zabezpieczone przed niepożądanymi zakłóceniami.

Wybór gatunków

18. Zalecane gatunki ryb wymieniono w dodatku 2. Procedury włączenia nowych gatunków podano w pkt 2.

Utrzymywanie ryb rodzicielskich

19. Szczegółowe informacje dotyczące utrzymania ryb rodzicielskich w zadowalających warunkach można znaleźć w wytycznej OECD nr 210 w sprawie badań (1). Ryby rodzicielskie należy karmić odpowiednim pokarmem raz lub dwa razy dziennie.

Postępowanie z zarodkami i larwami

20. Początkowo zarodki i larwy poddawane są narażeniu w obrębie głównej komory, w mniejszych komorach ze szkła lub stali nierdzewnej, wyposażonych w siatki po bokach lub na końcach, pozwalające na przepływ badanej substancji chemicznej przez komorę. Nieburzliwy przepływ przez te małe komory można uzyskać, zawieszając je na ramieniu przemieszczającym komory w górę i w dół, przy czym organizmy powinny być zawsze zanurzone.

21. W przypadku gdy do utrzymywania komórek jajowych wewnątrz głównej komory badawczej używane były pojemniki, kraty lub siatki, należy usunąć te ograniczenia po wylęgu larw, poza zachowaniem siatek zapobiegających ucieczce ryb. Jeśli zachodzi konieczność przeniesienia larw, nie można ich wystawiać na działanie powietrza i nie wolno używać siatek do wypuszczania ryb z pojemników z komórkami jajowymi. Moment takiego przeniesienia zależy od gatunku i przeniesienie nie zawsze jest konieczne.

▼M6

Woda

22. Woda, w której badane gatunki w próbie kontrolnej przeżywają co najmniej w tak dobrym stopniu jak w wodzie opisanej w dodatku 3, może być stosowana jako woda do badań. Powinna mieć stałą jakość w okresie trwania badania. Aby upewnić się, że woda rozcieńczająca nie będzie wpływała zbytnio na wyniki badania (np. wchodząc w reakcję z badaną substancją chemiczną) lub nie mała niekorzystnego wpływu na stado macierzyste, należy okresowo pobierać próbki wody do analizy. W przypadku gdy wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, należy mierzyć, np. co trzy miesiące, zawartość całkowitego węgla organicznego, przewodność właściwą, pH i zawiesinę ogólną. Pomiary pod kątem zawartości metali ciężkich (takich jak Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) i pestycydów należy wykonać, jeżeli jakość wody budzi wątpliwości. Szczegóły dotyczące analizy chemicznej i pobierania wody można znaleźć w pkt 34.

Roztwory do badań

23. Jeżeli jest to praktycznie możliwe, należy zastosować system przepływowy. W przypadku badań przepływowych niezbędny jest system ciągłego dozowania i rozcieńczania roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej (np. pompa dozująca, układ rozcieńczania proporcjonalnego, układ saturatora) do przesyłania szeregu stężeń do komór badawczych. Natężenia przepływów roztworów podstawowych i wody rozcieńczającej muszą być sprawdzane okresowo w trakcie badania i nie mogą różnić się w trakcie badania o więcej niż o 10 %. Za odpowiedni uznano natężenie przepływu równoważne co najmniej pięciu objętościom komory badawczej na 24 godziny (1). Należy starać się unikać stosowania rur z tworzywa sztucznego lub innych materiałów, które mogą zwierać aktywne biologicznie substancje chemiczne lub mogą adsorbować badaną substancję chemiczną.

24. Zaleca się przygotowanie roztworu podstawowego bez stosowania rozpuszczalników przez zwykłe wymieszanie lub zbełtanie badanej substancji chemicznej w wodzie rozcieńczającej w sposób mechaniczny (np. za pomocą mieszadła lub ultradźwięków). Jeżeli badana substancja chemiczna trudno rozpuszcza się w wodzie, należy postępować zgodnie z procedurami opisanymi w wytycznej OECD dotyczącej badania toksyczności wodnej trudnych substancji i mieszanin (*Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*) (36). Należy unikać stosowania rozpuszczalników, choć czasem może to być niezbędne w celu uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Przykłady odpowiednich rozpuszczalników podano w (36).

25. Należy unikać półstatycznych warunków badania, jeżeli nie przedstawi się uzasadnienia opartego na przekonujących powodach związanych z badaną substancją chemiczną (np. stabilność, ograniczona dostępność, wysokie koszty lub zagrożenie). W odniesieniu do techniki półstatycznej można przyjąć dwie różne procedury wymiany. Nowe roztwory do badań są przygotowywane w czystych komorach, a komórki jajowe i larwy, które przeżyły, są ostrożnie przenoszone do nowych komór, albo organizmy użyte do badań są utrzymywane w komorach badawczych, a część (co najmniej dwie trzecie) wody badawczej jest codziennie zmieniana.

PROCEDURA

Warunki narażenia na działanie substancji

Pobieranie komórek jajowych i czas trwania

26. Aby uniknąć błędu genetycznego, komórki jajowe pobiera się od co najmniej trzech par lub grup hodowlanych, zmieszanych i wybranych losowo w celu rozpoczęcia badania. W przypadku ciernika zobacz opis sztucznego zapłodnienia w dodatku 11. Badanie powinno rozpocząć się jak najszybciej po zapłodnieniu komórek jajowych i nie później niż 12 godzin

▼M6

po zapłodnieniu, przy czym zarodki powinny zostać zanurzone w roztworach do badań przed rozpoczęciem stadium bruzdkowania tarczek zarodkowych. Badanie należy kontynuować do momentu zakończenia różnicowania płci w grupie kontrolnej (60 dni po wykluciu w przypadku ryżanki japońskiej, ciernika i danio pręgowanego).

Obciążenie

27. Liczba zapłodnionych komórek jajowych na początku badania powinna wynosić co najmniej 120 na stężenie i powinna być rozdzielona na co najmniej 4 kontrpróby (dopuszcza się pierwiastkowy przydział do próby kontrolnej). Komórki jajowe należy rozmieścić losowo (z wykorzystaniem tabel statystycznych do randomizacji) między zabiegami. Wskaźnik obciążenia (zob. definicja w dodatku 1) powinien być wystarczająco niski, aby można było utrzymać stężenie rozpuszczonego tlenu na poziomie co najmniej 60 % ASV bez bezpośredniego napowietrzania komór. W odniesieniu do badań przepływowych zaleca się stosowanie wskaźnika obciążenia nieprzekraczającego 0,5 g/l na 24 godziny i nieprzekraczającego w żadnym momencie 5 g/l roztworu. Nie później niż po 28 dniach od zapłodnienia należy ponownie rozdzielić liczbę ryb przypadającą na kontrpróbę, tak aby każda kontrpróba zawierała jak najbardziej zbliżoną liczbę ryb. W przypadku wystąpienia śmiertelności związanej z narażeniem należy odpowiednio zmniejszyć liczbę kontrprób, aby utrzymywać jak najbardziej zbliżone zagęszczenie ryb między poziomami zabiegowymi.

Światło i temperatura

28. Fotoperiod i temperatura wody muszą być odpowiednie dla badanego gatunku (zob. dodatek 2 dotyczący warunków doświadczalnych w odniesieniu do badania rozwoju płciowego ryb).

Karmienie

29. Pokarm i karmienie mają decydujące znaczenie, a podanie odpowiedniej karmy na każdym etapie w odpowiednich odstępach czasu i w ilości wystarczającej do utrzymania prawidłowego wzrostu ma zasadnicze znaczenie. Należy podawać pokarm bez ograniczeń przy jednoczesnym minimalizowaniu nadwyżek. Aby uzyskać wystarczające tempo wzrostu, ryby należy karmić co najmniej dwa razy dziennie (dopuszczając podawanie karmy raz dziennie w weekendy) w co najmniej trzygodzinnych odstępach czasu. Nadwyżkę pokarmu i ekskrementy należy usuwać, aby zapobiec akumulacji odpadów. Pokarm i schemat żywienia są stale udoskonalane w miarę zdobywania doświadczenia, aby poprawić przeżywalność i zoptymalizować wzrost. Należy zatem podjąć starania, aby proponowany schemat został potwierdzony przez uznanych ekspertów. Na 24 godziny przed zakończeniem badania należy zaprzestać podawania pokarmu. Przykłady odpowiednich rodzajów pokarmu wymieniono w dodatku 2 (zob. również wytyczną OECD dotyczącą badania ryb (*Fish Testing Framework*) (39)).

Badane stężenia

30. Rozkład stężeń badanych substancji chemicznych powinien być zgodny z opisem w dodatku 4. Należy zastosować co najmniej trzy badane stężenia w co najmniej czterech kontrpróbach. Przy wyborze zakresu badanych stężeń w badaniach toksyczności ostrej należy wziąć pod uwagę krzywą zależności średniego śmiertelnego stężenia LC_{50} od okresu narażenia. Jeżeli dane mają być wykorzystane do oceny ryzyka, zaleca się użycie pięciu badanych stężeń.

31. Stężenia substancji chemicznej wyższe niż 10 % LC_{50} dla osobników dorosłych lub 10 mg/l, w zależności od tego, która z tych wartości jest niższa, nie wymagają badania. Maksymalne badane stężenie powinno wynosić 10 % LC_{50} w larwalnym/młodocianym stadium życia.

▼M6

Próby kontrolne

32. Oprócz badanych stężeń należy wykonać próbę kontrolną z wodą rozcieńczającą (≥ 4 kontrpróby) i, w stosownych przypadkach, próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem (≥ 4 kontrpróby). W badaniu należy wykorzystywać wyłącznie rozpuszczalniki, co do których sprawdzono, że nie mają istotnie statystycznego wpływu na badane punkty końcowe.

33. W przypadkach gdy używa się rozpuszczalnika, jego końcowe stężenie nie powinno być większe niż 0,1 ml/l (36) i powinno być takie samo we wszystkich komorach badawczych, z wyjątkiem próby kontrolnej z wodą rozcieńczającą. Należy jednak dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć użycia takich rozpuszczalników lub utrzymać stężenie rozpuszczalnika na minimalnym poziomie.

Częstotliwość oznaczeń i pomiarów analitycznych

34. Analizę chemiczną stężenia badanej substancji chemicznej należy przeprowadzić przed rozpoczęciem badania, aby sprawdzić zgodność z kryteriami akceptacji. Wszystkie kontrpróby należy analizować oddzielnie na początku i na końcu badania. W trakcie badania należy analizować jedną kontrpróbę na każde badane stężenie co najmniej raz na tydzień, zmieniając systematycznie kontrpróby (1,2,3,4,1,2….). Jeżeli próbki przechowuje się w celu późniejszej analizy, należy wcześniej zweryfikować metodę przechowywania. Próbki należy przefiltrować (np. przez filtr z porami o średnicy 0,45 μm) lub odwirować, aby mieć pewność, że oznaczenia substancji chemicznej zostaną wykonane w prawdziwym roztworze.

35. Podczas badania we wszystkich komorach badawczych należy mierzyć stężenie rozpuszczonego tlenu, pH, twardość ogólną, przewodność właściwą, zasolenie (w stosownych przypadkach) i temperaturę. Stężenie rozpuszczonego tlenu, zasolenie (w stosownych przypadkach) i temperaturę należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu, a pH, przewodność właściwą i twardość wody na początku i na końcu badania. Zalecane jest stałe monitorowanie temperatury w co najmniej jednej komorze badawczej.

36. Zaleca się, aby wyniki oparte były na mierzonych stężeniach. Jeżeli jednak stężenie badanej substancji chemicznej w roztworze można bez problemów utrzymywać w zakresie ± 20 % nominalnego stężenia przez okres badania, wówczas wyniki mogą być oparte albo na wartościach nominalnych, albo na mierzonych.

Monitorowanie i pomiary

Stadium rozwoju zarodkowego

37. Narażenie powinno rozpocząć się jak najszybciej po zapłodnieniu i przed rozpoczęciem stadium bruzdkowania tarczek zarodkowych oraz nie później niż 12 godzin po zapłodnieniu, aby zapewnić narażenie w trakcie wczesnego rozwoju zarodkowego.

Wylęg i przeżywalność

38. Obserwacje wylęgania i przeżywalności należy prowadzić co najmniej raz dziennie, a liczby należy odnotowywać. Martwe zarodki, larwy i młode ryby należy usunąć bezzwłocznie po ich zauważeniu, ponieważ mogą szybko ulec rozkładowi i rozdrobnieniu w wyniku działań innych ryb. Należy zachować najwyższą ostrożność przy usuwaniu martwych osobników, aby nie uderzyć lub nie uszkodzić fizycznie sąsiednich komórek jajowych/larw, które są bardzo delikatne i wrażliwe. Kryteria dotyczące zgonu zmieniają się stosownie do stadium życia:

— w odniesieniu do komórek jajowych: szczególnie we wczesnych stadiach znacząca utrata przezroczystości i zmiana w zabarwieniu spowodowane przez koagulację lub strącania białek, powodujące, że komórki jajowe przybierają białą barwę i stają się mętne;

▼M6

— w odniesieniu do larw i młodych ryb: bezruch, brak ruchu oddechowego, brak bicia serca lub białe matowe zabarwienie ośrodkowego układu nerwowego, lub brak reakcji na bodźce mechaniczne.

Nietypowy wygląd

39. Należy odnotować liczbę larw lub ryb charakteryzujących się nietypową budową ciała oraz opisać wygląd i naturę anomalii. Należy zauważyć, że występowanie nietypowych zarodków i larw jest naturalne i w próbach kontrolnych ich udział może wynosić kilka procent u niektórych gatunków. Nietypowe zwierzęta należy usunąć z komór badawczych dopiero po ich śmierci. Zgodnie jednak z dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych, jeżeli anomalie prowadzą do bólu, cierpienia, stresu lub trwałego uszkodzenia, a śmierć można w wiarygodny sposób przewidzieć, zwierzęta należy znieczulić i uśmiercić zgodnie z opisem w pkt 44 i traktować jako przypadki śmiertelne do celów analizy danych.

Nietypowe zachowanie

40. Należy odnotować anomalie, np. hiperwentylację, nieskoordynowane pływanie, nietypowy spokój i nietypowe zachowania podczas pobierania pokarmu, z chwilą ich pojawienia się.

Masa

41. Na koniec badania wszystkie pozostałe przy życiu ryby należy uśmiercić (znieczulić jeżeli konieczne jest pobranie próbek krwi) oraz zważyć mokrą masę poszczególnych ryb (osuszonych na bibule).

Długość

42. Na końcu badania należy zmierzyć długość poszczególnych ryb (standardową długość).

43. Obserwacje te skutkować będą zebraniem niektórych lub wszystkich następujących danych do sprawozdania:

— skumulowana śmiertelność;

— liczba zdrowych ryb pod koniec badania;

— moment rozpoczęcia wylęgu i jego zakończenia;

— długość i waga zwierząt, które przeżyły;

— liczba zdeformowanych larw;

— liczba ryb cechujących się nietypowym zachowaniem.

Pobieranie próbek ryb

44. Próbki ryb pobiera się jest w momencie zakończenia badania. Ryby, z których pobiera się próbki, należy uśmiercić za pomocą np. MS-222 (100–500 mg na litr zbuforowanego 200 mg $NaHCO_3$ na litr) lub FA-100 (2-metoksy-4-allilofenol: eugenol) oraz zmierzyć i zważyć mokrą masę poszczególnych ryb (osuszonych na bibule), lub je znieczulić, jeżeli konieczne jest pobranie próbek krwi (zob. pkt 49).

Pobieranie próbek w celu przeprowadzenia badania VTG i określenia płci metodą oceny histologicznej

45. Należy pobrać próbki wszystkich ryb i przygotować je do badania VTG i określenia płci. Wszystkie ryby należy poddać badaniu histologicznemu

▼M6

w celu określenia płci. W przypadku pomiarów VTG akceptuje się pobranie podpróbek z co najmniej 16 ryb z każdej kontrpróby. Jeżeli wyniki uzyskane z podpróbek okażą się niejasne, należy zbadać więcej ryb pod kątem VTG.

46. Procedura pobierania próbek w celu określenia VTG i płci zależy od metody analizy VTG:

Metoda z wykorzystaniem homogenatu głowy/ogona w celu analizy VTG

47. Rybę uśmierca się. Głowę i ogon każdej z ryb oddziela się od tułowia przez nacięcia wykonane bezpośrednio za płetwami piersiowymi i bezpośrednio za płetwą grzbietową za pomocą skalpela (zob. rys. 1). Głowę i ogon każdej z ryb waży się razem, nadaje indywidualny numer, zamraża w ciekłym azocie i przechowuje w temperaturze – 70 °C lub niższej w celu przeprowadzenia badania VTG. Część tułowia ryby numeruje się i umieszcza w odpowiednim środku utrwalającym w celu przeprowadzenia oceny histologicznej (22). Dzięki wykorzystaniu tej metody badanie VTG i histopatologię przeprowadza się w odniesieniu do każdej ryby, a ewentualne zmiany poziomu VTG można w związku z tym odnieść do płci fenotypowej lub płci genetycznej ryby (np. w przypadku ryżanki japońskiej i ciernika). W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z wytycznymi dotyczącymi homogenizacji (dodatek 5) i wytycznymi dotyczącymi oznaczania ilościowego VTG (dodatek 6).

Metoda z wykorzystaniem homogenatu wątroby w celu analizy VTG

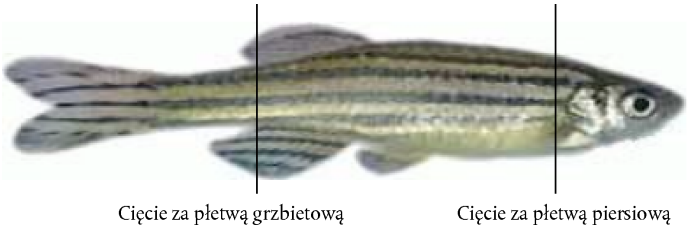
48. Rybę uśmierca się. Wątrobę wycina się i przechowuje w temperaturze – 70 °C lub niższej. Procedury zalecane przy wycinaniu wątroby i jej wstępnej obróbce można znaleźć w wytycznej OECD nr 229 w sprawie badań (37) lub rozdziale C.37 niniejszego załącznika (38). Wątroby poddaje się następnie oddzielnie procesowi homogenizacji opisanemu w wytycznej OECD nr 229 w sprawie lub rozdziale C.37 niniejszego załącznika. Zgromadzony supernatant wykorzystuje się w celu pomiaru VTG za pomocą homologicznej metody ELISA (zob. dodatek 6 zawierający przykład oznaczania ilościowego w odniesieniu do danio pręgowanego lub wytyczna OECD nr 229 w sprawie badań (37) w odniesieniu do ryżanki japońskiej). W przypadku zastosowania tego podejścia można również uzyskać dane dotyczące zarówno poziomu VTG, jak i histologii gonad w odniesieniu do poszczególnych ryb.

Metoda z wykorzystaniem osocza krwi w celu analizy VTG

49. Krew pobiera się od znieczulonej ryby przez nakłucie serca, nacięcie żyły ogonowej lub ogona i odwirowuje w temperaturze 4 °C w celu zgromadzenia osocza. Do momentu wykorzystania osocze przechowuje się w temperaturze – 70 °C lub niższej. Rybę uśmierca się i umieszcza w substancji utrwalającej w celu przeprowadzenia histologii. Zarówno próbkom osocza, jak i rybom nadaje się indywidualne numery w celu odniesienia poziomów VTG do płci ryby.

Rysunek 1

Sposób cięcia ryby w celu pomiaru VTG w homogenacie głowy/ogona i w celu histologicznej oceny części środkowej.



▼M6

Określanie płci genetycznej

50. Biologiczną próbkę służącą do określenia płci genetycznej pobiera się od pojedynczych osobników z gatunku posiadającego odpowiednie markery. W przypadku ryżanki japońskiej pobiera się płetwę odbytową lub płetwę grzbietową. Szczegółowy opis, obejmujący pobieranie próbek tkanek i określanie płci metodą PCR przedstawiono w dodatku 9. Również w przypadku ciernika opis pobierania próbek tkanek i określania płci metodą PCR przedstawiono w dodatku 10.

Pomiar VTG

51. Pomiar VTG należy wykonać metodą zweryfikowaną pod względem ilościowym i analitycznym. Informacje powinny być dostępne po wykonaniu wewnątrz- i międzylaboratoryjnego oznaczenia zmienności metody stosowanej w danym laboratorium. Przyczyną wewnątrz- i międzylaboratoryjnej zmienności są (najprawdopodobniej) różne stadia rozwojowe populacji ryb. Biorąc pod uwagę zmienność w pomiarze VTG, NOEC określone w oparciu o tylko ten punkt końcowy należy traktować z wielką ostrożnością. Dostępne są różne metody oceny wytwarzania VTG w przypadku gatunków ryb zastosowanych w tym badaniu. Metodą pomiaru, która jest zarówno stosunkowo czuła, jak i swoista, jest oznaczenie stężeń białka za pośrednictwem testu immunoenzymatycznego (ELISA). Należy wykorzystać homologiczne przeciwciała (wytworzone w reakcji na VTG tego samego gatunku) i najważniejsze homologiczne standardy.

Określania płci

52. W zależności od procedury pobierania próbek w celu określenia VTG całą rybę lub pozostałą środkowa część każdej z ryb umieszcza się w specjalnie wcześniej oznakowanej kasetce i utrwala w środku utrwalającym w celu histologicznego określenia płci (opcjonalnie również w celu określenia etapu rozwoju gonad). Wytyczne dotyczące utrwalania i zatapiania przedstawione zostały w dodatku 7 i w wytycznej OECD dotyczącej diagnozowania histopatologii gonad ryb związanej z układem hormonalnym (*Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads*) (22). Po zakończeniu tej procedury ryby zatapia się w blokach parafinowym. Poszczególne osobniki należy umieścić wzdłużnie w bloku parafinowym. Od każdego osobnika pobiera się co najmniej sześć skrawków wzdłużnych (grubości 3–5 μm) w płaszczyźnie przedniej, w tym tkankę z obydwu gonad. Odstęp między skrawkami powinien wynosić około 50 μm w przypadku samców i 250 μm w przypadku samic. Ponieważ jednak każdy blok będzie często zawierał samce i samice (w przypadku gdy więcej osobników niż jeden zostało zatopione w każdym bloku) odstęp między skrawkami w tych blokach powinien wynosić około 50 μm aż do uzyskania co najmniej sześciu wycinków gonad od każdego samca. Następnie odstęp między skrawkami można zwiększyć do około 250 μm w przypadku samic. Skrawki barwi się z zastosowaniem hematoksyliny i eozyny oraz bada przy użyciu mikroskopu świetlnego, w szczególności pod kątem płci (żeńska, męska, interseksualna lub brak zróżnicowania). Płeć interseksualną definiuje się jako obecność więcej niż jednego oocytu w jądrach na sześć zbadanych skrawków lub komórki spermatogenezy (tak/nie) w jajnikach. Histopatologia gonad oraz określenie etapów rozwoju jajników i jąder są nieobowiązkowe, ale w przypadku poddania ich badaniu wyniki należy przeanalizować statystycznie i zamieścić w sprawozdaniu. Należy zauważyć, że u niektórych gatunków ryb naturalnym zjawiskiem jest brak w pełni rozwiniętej pary gonad i może występować tylko jedna gonada (np. w przypadku ryżanki japońskiej i niekiedy w przypadku danio pręgowanego). Należy odnotowywać wszystkie tego typu obserwacje.

53. Określenie płci genetycznej w przypadku poszczególnych osobników ryżanki japońskiej opiera się na występowaniu lub braku genu określającego płeć męską DMY ryżanki, który jest zlokalizowany w chromosomie Y. Genetyczną płeć ryżanki można określić przez sekwencjonowanie genu DMY z DNA ekstrahowanego na przykład z kawałka płetwy odbytowej lub płetwy grzbietowej. Obecność DMY wskazuje na osobnika XY (samca)

▼M6

niezależnie od fenotypu, natomiast brak DMY wskazuje na osobnika XX (samicę) niezależnie od fenotypu (23). Wytyczne dotyczące preparowania tkanki i metody PCR przedstawiono w dodatku 9. Określanie płci genetycznej u poszczególnych osobników ciernika również wykonuje się z wykorzystaniem metody PCR opisanej w dodatku 10.

54. W sprawozdaniu należy podać występowanie osobników interseksualnych (zob. definicja w dodatku 1).

Drugorzędne cechy płciowe

55. U gatunków takich jak ryżanka japońska drugorzędne cechy płciowe są kontrolowane przez układ hormonalny, w związku z tym obserwacje fizycznego wyglądu ryb powinny, o ile to możliwe, zostać przeprowadzone pod koniec narażenia. W przypadku ryżanki japońskiej wykształcenie się brodawkowej zmiany na tylnej części płetwy odbytowej u samic jest spowodowane reakcją na androgeny. W rozdziale C.37 niniejszego załącznika (38) zamieszczone zostały odpowiednie zdjęcia drugorzędnych cech płciowych samców i androgenicznych samic.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

56. Ważne jest, aby punkt końcowy został określony przez ważny test statystyczny o największej mocy. Jednostkę eksperymentalną stanowi kontrpróba, ale w teście statystycznym uwzględnić należy zmienność między kontrpróbami. Blokowy schemat decyzyjny przedstawiony w dodatku 8 ma pomóc w zastosowaniu najodpowiedniejszego testu statystycznego na podstawie charakterystyki danych uzyskanych w badaniu. Statystyczny poziom istotności wynosi 0,05 w odniesieniu do wszystkich punktów końcowych.

Proporcje płci i płeć genetyczna

57. Proporcje płci należy przeanalizować pod kątem istotnego wpływu (podejście NOEC/LOEC) spowodowanego narażeniem za pomocą testu Jonckheere'a-Terpstry (test trendu), jeżeli istnieje monotoniczna zależność dawka-odpowiedź. Jeżeli stwierdzony zostanie brak monotoniczności, wówczas należy zastosować badanie porównań par. Jeżeli można uzyskać normalność rozkładu zmiennych i jednorodną wariancję, wykorzystuje się badanie Dunnetta. Jeżeli występuje niejednorodna wariancja, stosuje się test Tamhane'a-Dunnetta. W przeciwnym razie wykorzystuje się test Manna-Whitney'a skorygowany metodą Bonferroniego-Holma. Schemat blokowy przedstawiający statystykę proporcji płci znajduje się w dodatku 8. Proporcje płci należy przedstawić w tabelach jako proporcje stężenia ± SD (odchylenie standardowe) w odniesieniu do płci męskiej, żeńskiej, interseksualnej i niezróżnicowanej. Należy podkreślić poziom istotności. Przykłady można znaleźć w sprawozdaniu z weryfikacji badania rozwoju płciowego ryb fazy 2 (42). Płeć genetyczną należy podać jako odsetek odwróconej płci fenotypowej w odniesieniu do płci męskiej, żeńskiej, interseksualnej i niezróżnicowanej.

Stężenia VTG

58. Stężenia VTG należy przeanalizować pod kątem istotnego wpływu wywołanego narażaniem (podejście NOEC/LOEC). Lepiej jest zastosować test Dunnetta niż test t-Studenta z korektą Bonferroniego. W przypadku zastosowania korekty Bonferroniego zaleca się zastosowanie korekty metodą Bonferroniego-Holma. Należy uwzględnić przekształcenie logarytmiczne VTG w celu uzyskania normalności rozkładu zmiennych i jednorodności wariancji. Następnie, jeżeli zależność stężenie–odpowiedź jest stała i monotoniczna, lepiej jest zastosować test Jonckheere'a-Terpstry niż którykolwiek powyższych. Jeżeli zastosowano testy t-Studenta lub test Dunnetta, nie ma

▼M6

potrzeby stosowania analizy wariancji F w dalszym postępowaniu. Szczegóły opisano w schemacie znajdującym się w dodatku 8. Wyniki należy przedstawić w tabelach jako średnie stężenia ± SD (odchylenie standardowe) oddzielnie dla płci męskiej, żeńskiej, interseksualnej i niezróżnicowanej. Należy podkreślić poziom istotności w przypadku fenotypowych samic i fenotypowych samców. Przykłady można znaleźć w sprawozdaniu z weryfikacji badania rozwoju płciowego ryb fazy 2 (42).

Badana substancja chemiczna: stężenia rzeczywiste

59. Rzeczywiste stężenia badanej substancji chemicznej w komorach należy analizować z częstotliwościami opisanymi w pkt 34. Wyniki należy przedstawić w tabelach jako średnie stężenia ± SD (odchylenie standardowe) w odniesieniu do kontrprób, jak również w odniesieniu do stężeń z informacją dotyczącą liczby próbek i podkreśleniem wartości oddalonych od średniego stężenia zabiegu o ± 20 %. Przykłady można znaleźć w sprawozdaniu z weryfikacji badania rozwoju płciowego ryb fazy 2 (42).

Interpretacja wyników

60. Wyniki badania należy ostrożnie interpretować w przypadku, gdy mierzone stężenia badanej substancji chemicznej w roztworach do badań oscylują na poziomie granicy wykrywalności metody analitycznej.

Sprawozdanie z badania

61. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— istotne właściwości fizykochemiczne; dane dotyczące tożsamości chemicznej, w tym czystości i metody analitycznej oznaczania ilościowego badanej substancji chemicznej.

Warunki badania

— zastosowana procedura badawcza (np. przepływowa, badanie półstatyczne/wymiana); projekt badania obejmujący badane stężenia, metodę przygotowywania roztworów podstawowych (w załączniku), częstotliwość wymiany (jeżeli został zastosowany środek rozpuszczający, należy podać jego stężenie);

— badane stężenia nominalne, średnie mierzonych wartości oraz ich odchylenia standardowe w komorach badawczych, a także metoda uzyskania takich wartości (zastosowaną metodę analityczną należy przedstawić w załączniku); dowody świadczące o tym, że pomiary odnoszą się do stężeń badanej substancji chemicznej w prawdziwym roztworze;

— jakość wody w komorach badawczych: pH, twardość, temperatura i stężenie rozpuszczonego tlenu;

— szczegółowe informacje dotyczące karmienia (np. rodzaj pokarmu, źródło, podana ilość i częstotliwość podawania oraz, w stosownych przypadkach, analiza pod kątem zanieczyszczeń (np. PCB, WWA oraz całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych)).

Wyniki

— dowody świadczące o tym, że próby kontrolne spełniają kryteria ważności: dane dotyczące wskaźnika wylęgu należy przedstawić w tabelach jako odsetek na kontrpróbę i na stężenie. Należy podkreślić wartości oddalone od kryteriów akceptacji (w próbach kontrolnych). Informacje dotyczące przeżywalności należy przedstawić jako odsetek przypadający na kontrpróbę i na stężenie. Należy podkreślić wartości oddalone od kryteriów ważności (w próbach kontrolnych);

— Jasno sformułowane informacje dotyczące wyników uzyskanych w odniesieniu do różnych zaobserwowanych punktów końcowych: przeżycie zarodków i skuteczny wylęg, anomalie w wyglądzie zewnętrznym, długość

▼M6

i masa, pomiary VTG (ng/g homogenatu, ng/ml osocza lub ng/mg wątroby), histologia gonad, proporcja płci, dane dotyczące płci genetycznej, przypadki wszystkich nietypowych reakcji ryb i wszystkie widoczne efekty spowodowane przez badaną substancję chemiczną.

62. Wyniki należy przedstawić jako średnie wartości ± odchylenie standardowe (SD) lub błąd standardowy (SE). Jako dane statystyczne należy podać co najmniej NOEC i LOEC oraz przedziały ufności. Należy postępować według statystycznego schematu blokowego (dodatek 8).

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, wytyczna nr 210 w sprawie badań, Wytyczne dotyczące badania substancji chemicznych, OECD, Paryż.

(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, s. 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, s. 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, s. 337-347.

(5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen i P. Bjerregaard (2001a), „Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 533-541.

(10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and 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, s. 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, s. 1 699–1 708.

(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, s. 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 aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney

▼**M6**

hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction", Aquatic Toxicology 70, s. 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, s. 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, s. 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, s. 101-105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L. i Bjerregaard, P (2001b), „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, s. 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, s. 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, s. 237–243.

(20) Scholz, S. i N. Kluver (2009), Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development 3, s. 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, s. 1 088–1 098.

(22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Seria dotycząca badań i oceny, nr 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paryż.

(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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 279-290.

▼**M6**

(28) Holbech, H., K. Kinnberg, 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 11-21.

(33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen iP. Bjerregaard (2007), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, s 165-170.

(34) Rozdział C.14 niniejszego załącznika, Badanie wzrostu młodych ryb.

(35) Rozdział C.4 niniejszego załącznika, Szybka biodegradowalność.

(36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Seria dotycząca badań i oceny, nr 23, OECD, Paryż.

(37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, wytyczna nr 229 w sprawie badań, Wytyczne dotyczące badania substancji chemicznych, OECD, Paryż.

(38) Rozdział C.37 niniejszego załącznika, 21-dniowe badanie ryb: krótkoterminowa analiza przesiewowa aktywności estrogennej i androgennej oraz zahamowania aktywności aromatazy.

(39) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Seria dotycząca badań i oceny, nr 171, OECD, Paryż.

(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, s. 768-779.

(41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Seria dotycząca badań i oceny, nr 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paryż.

(42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Seria dotycząca badań i oceny, nr 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paryż.

(43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Seria dotycząca badań i oceny, nr 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paryż.

(44) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33.

▼**M6**

Dodatek 1

Skróty i definicje

Szczytowy punkt końcowy: mający wpływ na poziomie populacji

ASV: wartość nasycenia powietrzem

Biomarker: mający wpływ na poziomie indywidualnym

Substancja chemiczna: oznacza substancję lub mieszaninę.

Dph: dni po wylęgu

DMY: gen Y domenny DM konieczny do rozwoju samców ryżanki japońskiej

ELISA: test immunoenzymatyczny

Masa ryb: mokra masa ryb (osuszonych na bibule)

FSDT: Badanie rozwoju płciowego ryb

Oś podwzgórze–przysadka–nadnercza: oś podwzgórze–przysadka–nadnercza

Ryba interseksualna: ryba posiadająca więcej niż jeden oocyt w jądrach na sześć zbadanych skrawków lub komórki spermatogeniczne w jajnikach (tak/nie)

Wskaźnik obciążenia: mokra masa ryb na objętość wody

MOA: charakter działania

RT-PCR: odwrotna transkrypcja z łańcuchową reakcją polimerazową

Badana substancja chemiczna: oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej

Ryba niezróżnicowana: ryba z gonadami bez widocznych komórek zarodkowych

VTG: witellogenina

▼M6

Dodatek 2

Warunki badania rozwoju płciowego ryb (gatunki słodkowodne)

1. Zalecane gatunki	Ryżanka japońska (*Oryzias latipes*)	Danio pręgowany (*Danio rerio*)	Ciernik (*Gasterostreus aculeatus*)
2. Rodzaj badania	Przepływowe lub półstatyczne	Przepływowe lub półstatyczne	Przepływowe lub półstatyczne
3. Temperatura wody	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Jakość oświetlenia	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)
5. Natężenie światła	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)
6. Fotoperiod	12–16 godzin światła, 8–12 godzin ciemności	12–16 godzin światła, 8–12 godzin ciemności	16 godzin światła, 8 godzin ciemności
7. Minimalna wielkość komór	Pojedyncza komora powinna zawierać minimum 7 l wody	Pojedyncza komora powinna zawierać minimum 7 l wody	Pojedyncza komora powinna zawierać minimum 7 l wody
8. Liczba wymian objętości roztworów do badań	Minimum 5 razy dziennie	Minimum 5 razy dziennie	Minimum 5 razy dziennie
9. Wiek organizmów użytych do badania w momencie rozpoczęcia narażenia	Świeżo zapłodnione komórki jajowe (wczesne stadium blastuli)	Świeżo zapłodnione komórki jajowe (wczesne stadium blastuli)	Świeżo zapłodnione komórki jajowe (wczesne stadium blastuli)
10. Liczba komórek jajowych na zabieg	Minimum 120	Minimum 120	Minimum 120
11. Liczba zabiegów	Co najmniej 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)	Co najmniej 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)	Co najmniej 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)
12. Liczba kontrprób na zabieg	Co najmniej 4 (chyba że akceptuje się pierwiastkowy przydział do prób kontrolnych)	Co najmniej 4 (chyba że akceptuje się pierwiastkowy przydział do prób kontrolnych)	Co najmniej 4 (chyba że akceptuje się pierwiastkowy przydział do prób kontrolnych)
13. Schemat żywienia	Żywe *Artemia*, zamrożone dorosłe solowce, pokarm w płatkach itd. Zaleca się karmienie dwa razy dziennie	Specjalny pokarm dla narybku, żywe *Artemia*, zamrożone dorosłe solowce, pokarm w płatkach itd. Zaleca się karmienie dwa razy dziennie	Żywe *Artemia*, zamrożone dorosłe solowce, pokarm w płatkach itd. Zaleca się karmienie dwa razy dziennie
14. Napowietrzanie	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadnie poniżej 60 % nasycenia	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadnie poniżej 60 % nasycenia	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadnie poniżej 70 % nasycenia

▼**M6**

15. Woda rozcieńczająca	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub woda regenerowana	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub woda regenerowana	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub woda regenerowana
16. Czas trwania narażenia na badaną substancję chemiczną	60 dni po wylęgu	60 dni po wylęgu	60 dni po wylęgu
17. Biologiczne punkty końcowe	Pozytywny wynik wylęgu, morfologia makroskopowa po przeżyciu, VTG histologia gonad, płeć genetyczna Proporcja płci	Pozytywny wynik wylęgu, przeżywalność Morfologia makroskopowa, VTG histologia gonad, proporcja płci	Pozytywny wynik wylęgu, przeżywalność Morfologia makroskopowa, VTG histologia gonad, proporcja płci
18. Kryteria dopuszczalności badania dla połączonych kontrprób prób kontrolnych	Pozytywny wynik wylęgu > 80 %	Pozytywny wynik wylęgu > 80 %	Pozytywny wynik wylęgu > 80 %
	Przeżywalność po wylęgu ≥ 70 %	Przeżywalność po wylęgu ≥ 70 %	Przeżywalność po wylęgu ≥ 70 %
	Wzrost (mokra masa ryb osuszonych na bibule) > 150 mg	Wzrost (mokra masa ryb osuszonych na bibule) >75 mg	Wzrost (mokra masa ryb osuszonych na bibule) > 120 mg
	Długość (długość standardowa) > 20 mm	Długość (długość standardowa) > 14 mm	Długość (długość standardowa) > 20 mm
	Proporcja płci (% samców i samic) 30–70 %	Proporcja płci (% samców lub samic) 30–70 %	Proporcja płci (% samców lub samic) 30–70 %

▼**M6**

Dodatek 3

Właściwości chemiczne akceptowalnej wody rozcieńczającej

SKŁADNIK	STĘŻENIE
Cząstki stałe	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 mg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 mg/l
Chlor resztkowy	< 10 mg/l
Pestycydy fosforoorganiczne ogółem	< 50 ng/l
Pestycydy chloroorganiczne ogółem plus polichlorowane bifenyle	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l

▼**M6**

Dodatek 4

Na podstawie metody badawczej c.14 /wytyczne dotyczące badanych stężeń

Kolumna (liczba stężeń między 100 i 10 lub między 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

(*) Z kolumny można wybrać serię trzech (lub więcej) kolejnych stężeń. Średnie wartości między stężeniami w kolumnie (x) zostały podane w kolumnie (2x + 1). Poszczególne wartości przedstawiają stężenia wyrażone jako ułamek objętościowy lub ułamek masowy (mg/l lub µg/l). Wartości mogą być zwielokrotniane lub dzielone przez każdą potęgę liczby 10, stosownie do okoliczności. Kolumnę 1 można zastosować, jeśli istniała znaczna niepewność dotycząca poziomu toksyczności.

▼M6

Dodatek 5

Wytyczne dotyczące homogenizacji głowy i ogona młodych osobników danio pręgowanego, *Pimephales promelas*, ciernika i ryżanki japońskiej

Celem niniejszej części jest opisanie procedur poprzedzających ilościowe oznaczenie stężenia VTG. Można stosować inne procedury, których wynikiem jest porównywalne oznaczanie ilościowe VTG. Istnieje możliwość określenia stężenia VTG w osoczu krwi lub wątrobie zamiast w homogenacie głowy/ogona.

Procedura

1. Ryby znieczula się i uśmierca zgodnie z opisem badania.

2. Głowę i ogon ryb odcina się zgodnie z opisem badania. **Uwaga**: przyrządy do przeprowadzania sekcji i deskę do krojenia należy wypłukać i odpowiednio wyczyścić (np. za pomocą 96 % etanolu) przed obróbką każdej pojedynczej ryby w celu uniknięcia przeniesienia „zanieczyszczenia VTG" z samic lub samców, u których VTG występuje, na samce, które jej nie posiadają.

3. Łączną masę głowy i ogona każdej z ryb mierzy się z dokładnością do pełnego miligrama.

4. Po zważeniu tych części umieszcza się je w odpowiednich probówkach (np. probówkach Eppendorfa o pojemności 1,5 ml) i zamraża w temperaturze – 80 °C do czasu homogenizacji lub bezpośrednio poddaje homogenizacji z lodem za pomocą dwóch tłuczków z tworzywa sztucznego. (Zastosować można również inne metody, pod warunkiem że stosując je, używa się lodu i można uzyskać jednorodną masę). **Uwaga**: *probówki należy odpowiednio ponumerować, tak by głowa i ogon danej ryby mogły zostać przypisane do odpowiadających im części ciała wykorzystywanych do histologii gonad*.

5. Po uzyskaniu homogenicznej masy dodaje się 4–10-krotność wagi tkanki lodowatego **roztworu buforowego do homogenizacji** (*) (zwrócić uwagę na rozcieńczenie). Mieszaninę należy dalej rozdrabniać za pomocą tłuczków dopóki nie stanie się jednorodna. **Ważna uwaga**: *do każdej ryby wykorzystuje się nowe tłuczki.*

6. Próbki umieszcza się z lodem aż do odwirowania w temp. 4 °C przy 50 000 g przez 30 min.

7. Użyć pipety do wprowadzenia porcji supernatantu o objętości 20–50 µl (zwrócić uwagę na ilość) do **co najmniej dwóch** probówek przez zanurzenie końcówki pipety pod znajdującą się na wierzchu warstwę tłuszczu i ostrożne zassanie supernatantu bez fragmentów tłuszczu lub grudek.

8. Do momentu wykorzystania probówki przechowuje się w temperaturze – 80 °C.

(*) *Roztwór buforowy do homogenizacji:*

50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % koktajlu inhibitorów proteaz (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl koktajlu inhibitorów proteaz (lub odpowiednika koktajli inhibitorów proteaz).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Koktajl inhibitorów proteaz: firmy Sigma (w przypadku tkanki ssaków), numer produktu **P 8340**.

Uwaga:roztwór buforowy do homogenizacji należy wykorzystać w tym samym dniu, w którym został sporządzony. Podczas stosowania należy umieścić go w lodzie.

▼M6

Dodatek 6

Wytyczne dotyczące oznaczania ilościowego witellogeniny w homogenacie głowy i ogona w odniesieniu do danio pręgowanego (*Danio rerio*) (METODA Holbecha i in., 2001, zmodyfikowana). można wykorzystać inne procedury z zastosowaniem homologicznych przeciwciał i standardów

1. Mikropłytki do miareczkowania (certyfikowane płytki Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Dania) powlekane wcześniej 5 µg/ml przeciwciał IgG przeciw lipowitelinie danio pręgowanego płucze się i czyści trzy razy za pomocą roztworu buforowego do przemywania (*).

2. Standardowa ilość oczyszczonej witellogeniny pochodzącej od danio pręgowanego ([1]) rozcieńcza się seriami po 0,2, 0,5, 1, 5, 10 i 20 20 ng/ml w roztworze buforowym do rozcieńczania (**), a próbki rozcieńcza się co najmniej 200 razy (aby nie dopuścić do efektu matrycy) w roztworze buforowym do rozcieńczania i nakłada na płytki. Stosuje się podwójną próbę kontrolną. W każdym dołku umieszcza się 150 µl. Stosuje się podwójne wzorce i potrójne próbki. Próbki inkubuje się przez całą noc w temperaturze 4 °C w wytrząsarce.

3. Płytki przemywa się pięć razy roztworem buforowym do przemywania (*).

4. HRP dołączona do łańcucha dekstranu (np. AMDEX A/S, Dania) i sprzężone przeciwciała rozcieńczane są w roztworze buforowym do przemywania; rzeczywisty stopień rozcieńczenia różni się w zależności od partii i wieku. W każdym dołku umieszcza się 150 µl i płytki inkubuje się przez godzinę w temperaturze pokojowej w wytrząsarce.

5. Płytki przemywa się pięć razy roztworem buforowym do przemywania (*), a dno płytek ostrożnie czyści się etanolem.

6. W każdym dołku umieszcza się 150 µl TMB plus (***). Należy chronić płytkę przed światłem za pomocą folii aluminiowej i obserwować zmianę koloru w wytrząsarce.

7. Po uzyskaniu pełnej krzywej wzorcowej działanie enzymów zatrzymuje się przez dodanie do każdego dołka 150 µl 0,2 M H_2SO_4.

8. Absorbancję mierzy się przy 450 nm (np. na czytniku płytek Molecular Devices Thermomax). Dane analizuje się za pomocą zintegrowanego oprogramowania (np. Softmax).

(*) Roztwór buforowy do przemywania:

roztwór podstawowy chlorku sodu buforowanego fosforanami (****)	500,0	ml
Roztwór wzorcowy albuminy surowicy bydlęcej (BSA)	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Należy wyregulować pH do 7,3 i dopełnić do 5 l H_2O oczyszczoną w systemie Millipore. Roztwór należy przechowywać w temperaturze 4 °C.

(**) Roztwór buforowy do rozcieńczania:

roztwór podstawowy chlorku sodu buforowanego fosforanami (****)	100,0	ml
Roztwór wzorcowy albuminy surowicy bydlęcej (BSA)	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Należy wyregulować pH do 7,3 i dopełnić do 1 l H_2O oczyszczoną w systemie Millipore. Roztwór należy przechowywać w temperaturze 4 °C.

(***) TMB plus to gotowy do zastosowania substrat wyprodukowany przez KemEnTec (Dania). Jest on wrażliwy na światło. Roztwór należy przechowywać w temperaturze 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), oczyszczony zgodnie z: 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**

(****) Roztwór podstawowy chlorku sodu buforowanego fosforanami

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Należy wyregulować pH do 6,8 i dopełnić do 2 l H_2O oczyszczonej w systemie Millipore. Roztwór należy przechowywać w temperaturze pokojowej.

▼M6

Dodatek 7

Wytyczne dotyczące sporządzania preparatów skrawków tkanek do określenia płci i etapu rozwoju gonad

Celem niniejszej części jest opisanie procedur poprzedzających ocenę skrawków histologicznych. Można stosować inne procedury, których wynikiem jest podobne określenie płci i etapu rozwoju gonad.

Z kilkoma wyjątkami procedury te mają podobny charakter w odniesieniu do ryżanki japońskiej i danio pręgowanego.

Uśmiercenie, autopsja i utrwalenie tkanek

Cele:

1. Zapewnienie humanitarnego uśmiercania ryb.

2. Uzyskanie niezbędnych wartości wagi i pomiarów ciała.

3. Ocena drugorzędnych cech płciowych.

4. Wycięcie tkanek do analizy VTG.

5. Utrwalenie gonad.

Procedury:

1. Ryby należy uśmiercać tuż przed autopsją. W związku z tym nie należy uśmiercać kilku ryb naraz, jeżeli nie ma wystarczającej liczby osób dokonujących autopsji.

2. Ryby wyjmuje się z komory badawczej za pomocą małej siatki i przenosi w pojemniku transportowym na miejsce autopsji.

3. Ryby umieszcza się w roztworze do uśmiercania. Wyjmuje się je z roztworu, gdy nastąpi zatrzymanie oddechu i ryby nie reagują na bodźce zewnętrzne.

4. Ryby waży się na mokro.

5. W celu przygotowania tkanek do analizy VTG można umieścić rybę na korkowej podkładce na stoliku mikroskopu preparacyjnego.

   a) W przypadku danio pręgowanego głowę odcina się tuż za płetwą piersiową, a ogon tuż za płetwą grzbietową.

   b) W przypadku ryżanki japońskiej jamę brzuszną otwiera się, wykonując ostrożnie nacięcie biegnące wzdłuż środkowej linii brzucha od obręczy barkowej do punktu znajdującego się tuż za odbytem. Ostrożnie usuwa się wątrobę za pomocą małych szczypczyków i małych nożyczek.

6. Próbkę do analizy VTG umieszcza się w probówkach Eppendorfa i natychmiast zamraża w ciekłym azocie.

7. Tuszę wraz z gonadami umieszcza się w oznakowanej wcześniej kasecie z tworzywa sztucznego przeznaczonej na tkanki, którą przenosi się do utrwalacza Davidsona lub Bouina. Objętość utrwalacza powinna być co najmniej 10 razy większa niż przybliżona objętość tkanek. Pojemnik ze środkiem utrwalającym wstrząsa się delikatnie przez pięć sekund w celu usunięcia bąbelków powietrza z kasety.

8. a) Wszystkie tkanki pozostawia się na noc w utrwalaczu Davidsona, a następnego dnia przenosi do pojedynczych pojemników z 10 % obojętną zbuforowaną formaliną. Pojemniki z kasetami wstrząsa się delikatnie przez pięć sekund, aby formalina należycie przeniknęła do kasetek.

▼M6

b) Tkanki pozostają w utrwalaczu Bouina przez 24 godziny, a następnie przenoszone są do 70 % etanolu.

Postępowanie z tkankami

Cele:

1. Odwodnić tkankę, aby umożliwić należyte nasączenie parafiną.

2. Zaimpregnować tkankę parafiną w celu utrzymania spójności tkanki i stworzenia stabilnej powierzchni na potrzeby mikrotomii.

Procedury:

3. Oznakowane kasety z tkankami wyjmuje się z formaliny/etanolu i umieszcza w koszyczkach do obróbki. Koszyczki do obróbki umieszcza się w procesorze tkankowym.

4. Wybiera się program obróbki.

5. Po zakończeniu cyklu obróbki w procesorze tkankowym można przenieść koszyczki do stacji do zatapiania.

Zatapianie

Cel:

Odpowiednie ułożenie próbki w zestalonej parafinie na potrzeby mikrotomii.

Procedury:

1. Koszyczki z kasetami wyjmuje się z procesora i zanurza w wypełnionej parafiną przedniej komorze modułu podgrzewającego stacji do zatapiania albo kasety przenosi się do oddzielnego podgrzewacza parafiny.

2. Pierwszą kasetę przeznaczoną do zatopienia wyjmuje się z przedniej komory modułu podgrzewającego stacji do zatapiania lub podgrzewacza parafiny. Zdejmuje się i odrzuca pokrywę kasety, a oznaczenie na kasecie porównuje się z danymi dotyczącymi zwierzęcia w celu wyjaśnienia ewentualnych rozbieżności przed zatopieniem.

3. Wybiera się formę do zatapiania o odpowiednich rozmiarach.

4. Formę podstawia się pod dozownik modułu dozującego i wypełnia roztopioną parafiną.

5. Próbkę wyjmuje się z kasety i umieszcza w roztopionej parafinie w formie. W odniesieniu do każdej formy z parafiną czynność tę powtarza się dla 4–8 próbek. Rozmieszczenie poszczególnych ryb oznacza się poprzez umieszczenie ryby numer jeden pod kątem 180 stopni w stosunku do ryb 2–4/8.

6. Dodaje się dodatkową parafinę w celu zakrycia próbki.

7. Formę z podstawą kasety umieszcza się na płycie chłodzącej modułu chłodzącego.

8. Po zestaleniu parafiny blok (tj. zastygniętą parafinę zawierającą tkanki i podstawę kasety) wyjmuje się z formy.

Mikrotomia

Cel:

Cięcie i przygotowanie skrawków histologicznych do barwienia.

Procedury:

1. Wstępny etap mikrotomii określany jako „licowanie” przebiega następująco:

   a. blok parafiny umieszcza się w uchwycie mikrotomu.

   b. Obracając pokrętłem mikrotomu, przesuwa się uchwyt i odcina grube skrawki parafinowej powierzchni bloku aż do momentu, gdy nóż dotrze do zatopionych tkanek.

▼M6

c. mikrotom ustawia się tak, aby otrzymać skrawki o grubości 3–5 mikronów. Uchwyt przesuwa się i z bloku odcięty zostaje szereg skrawków w celu usunięcia wszelkich artefaktów powstałych na powierzchni cięcia tkanki podczas zgrubnego odcinania;

d. blok można wyjąć z uchwytu i umieścić na lodzie górną częścią w dół w celu nasączenia tkanki.

2. Następnym etapem mikrotomii jest końcowy podział i naciągnięcie skrawków tkanki na szkiełka. Procedury te przebiegają w następujący sposób:

a. Jeżeli blok umieszczono na lodzie, zdejmuje się go z lodu i ponownie umieszcza w uchwycie mikrotomu.

b. w przypadku gdy ustawiona w mikrotomie grubość skrawka wynosi 3–5 mikronów, uchwyt przesuwa się, obracając pokrętłem mikrotomu. Od bloku odcina się skrawki do momentu uzyskania „wstęgi" obejmującej co najmniej jeden odpowiedni skrawek zawierający gonady. (Jeżeli podczas odcinania skrawków zaistnieje taka konieczność, blok można wyjąć z uchwytu i umieścić na lodzie górną częścią w dół w celu nasączenia tkanki, a następnie ponownie umieścić w uchwycie).

c. Skrawki umieszcza się płasko na powierzchni wody w łaźni wodnej. Próbuje się uzyskać co najmniej jeden skrawek, pod którym nie ma żadnych nierówności ani pęcherzyków powietrza.

d. Szkiełko mikroskopowe zanurza się pod najlepszym skrawkiem i wyjmuje się skrawek z wody za pomocą szkiełka. Proces ten określa się jako naciągnie skrawka na szkiełko.

e. W przypadku zestawu ryb przygotowuje się trzy skrawki. Drugi i trzeci skrawek odcina się w odstępach 50 mikronów od pierwszego. Jeżeli ryby nie zostały osadzone w parafinie z gonadami na tym samym poziomie podziału, należy odciąć więcej skrawków, aby zapewnić uzyskanie z każdej ryby co najmniej sześciu skrawków zawierających gonady.

f. Za pomocą specjalnego pisaka na szkiełku zapisuje się numer bloku, z którego uzyskano szkiełko.

g. Szkiełko umieszcza się w stelażu do barwienia.

h. Blok wyjmuje się z uchwytu i umieszcza górną częścią w dół w celu przechowania;

Barwienie, zamykanie szkiełkiem nakrywkowym i opisywanie szkiełek

Cele:

— Barwienie skrawków na potrzeby oceny histologicznej.

— Trwałe uszczelnienie naciągniętych i zabarwionych tkanek.

— Trwałe oznaczenie zabarwionych skrawków w sposób umożliwiający pełną identyfikowalność.

Procedury:

1. Barwienie

a. Szkiełka przed barwieniem przez całą noc suszy się powietrzem.

b. Do barwienia skrawków stosuje się hematoksylinę i eozynę.

2. Zamknięcie szkiełkiem nakrywkowym

a. Szkiełka nakrywkowe można nakładać ręcznie lub automatycznie.

b. Szkiełko zanurza się w ksylenie lub w preparacie TissueClear, a nadmiar ksylenu/TissueClear delikatnie usuwa się ze szkiełka.

▼**M6**

c. W pobliżu końca szkiełka, położonego przeciwlegle do zmatowionego końca, lub na szkiełko nakrywkowe nanosi się około 0,1 ml medium zamykającego.

d. Szkiełko nakrywkowe pochyla się pod niewielkim kątem w trakcie nakładania na szkiełko podstawowe.

3. Opisywanie

e. Etykieta na każdym szkiełku powinna zawierać następujące informacje.

i. Nazwa laboratorium

ii. Gatunek

iii. Nr próbki / nr szkiełka

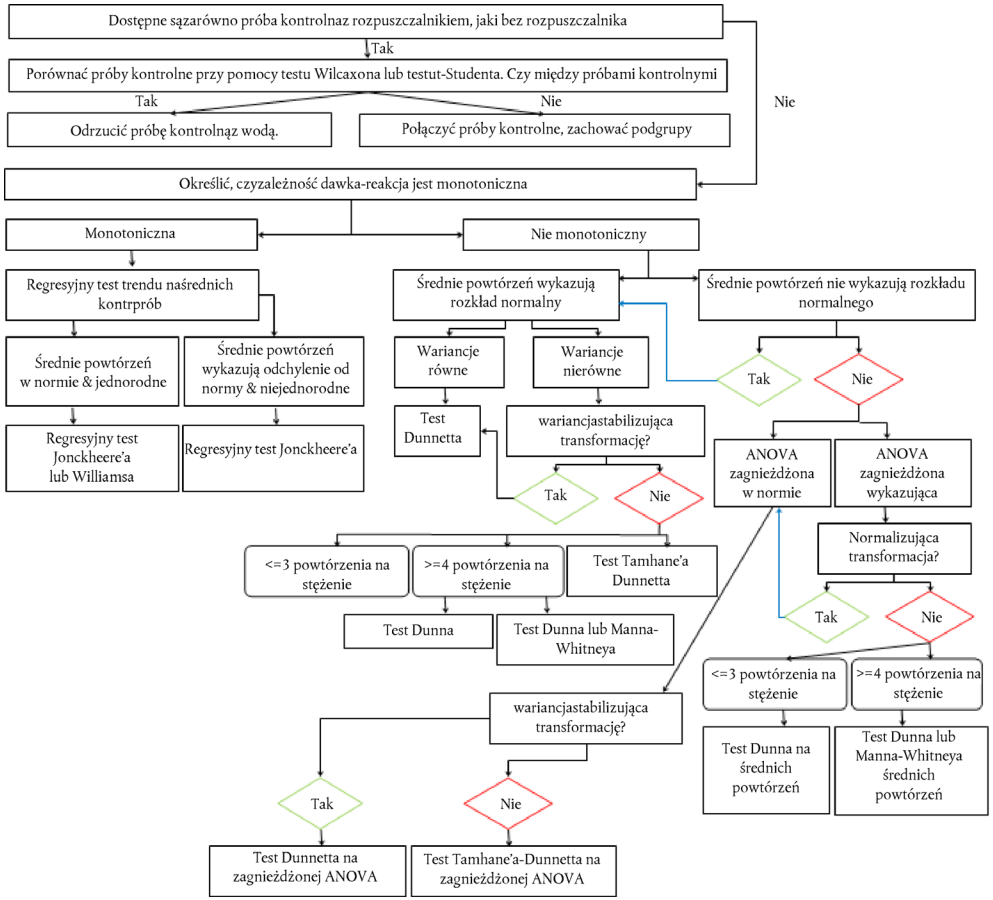
iv. Substancja chemiczna / grupa poddana zabiegowi

v. Data

▼M6

Dodatek 8

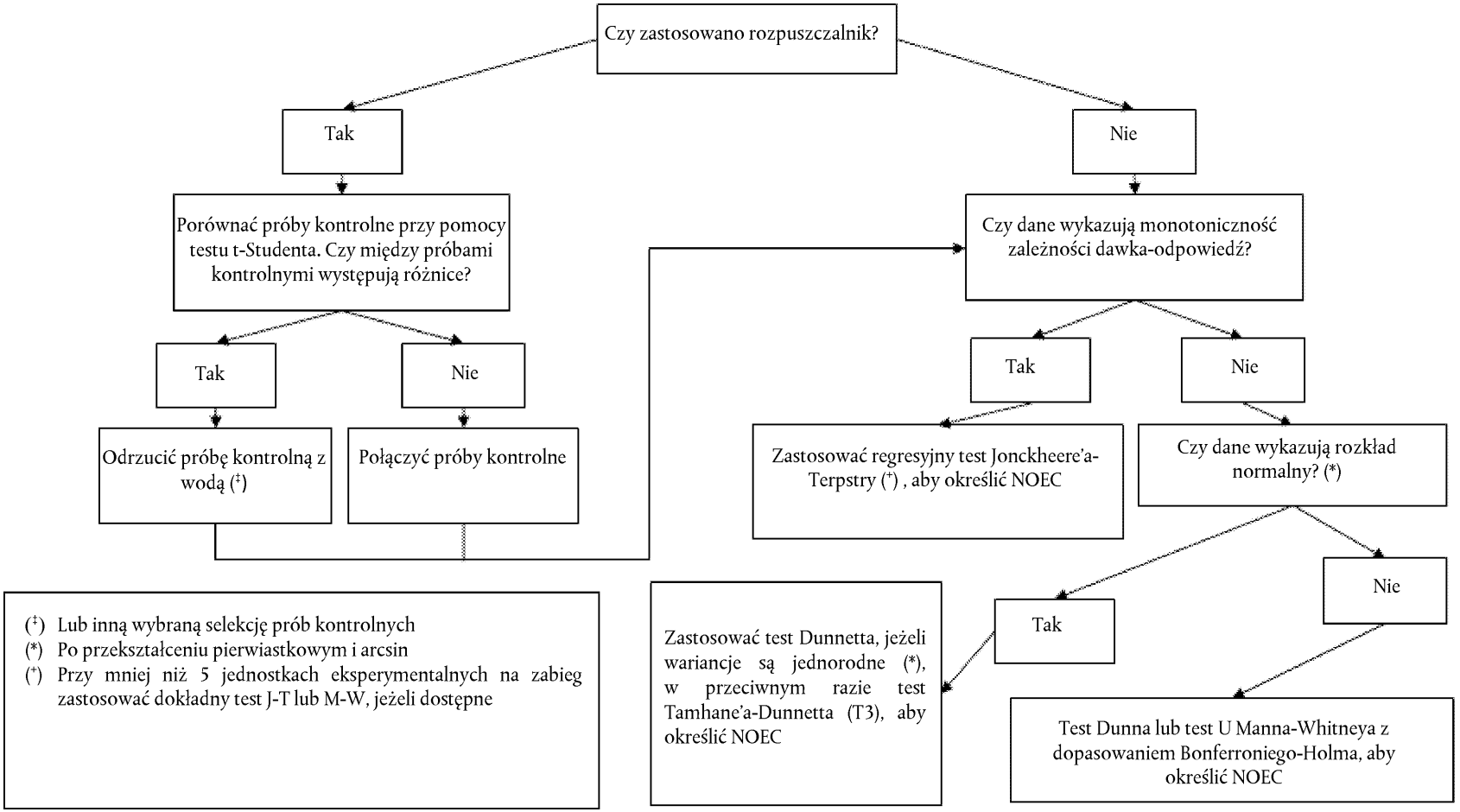
Statystyczny schemat blokowy analizy poziomu witellogeniny



02008R0440 — PL — 16.10.2019 — 008.001 — 2318

▼M6

Statystyczny schemat blokowy analizy proporcji płci



▼M6

Dodatek 9

Wytyczne dotyczące pobierania próbek tkanek w celu określenia płci genetycznej oraz w celu określenia płci genetycznej metodą PCR

Pobieranie, przygotowanie i przechowywanie próbek tkanek przed określaniem płci genetycznej metodą PCR w przypadku ryżanki (opracowanie: Laboratory for Aquatic Organisms of Bayer CropScience AG)

1. Za pomocą małych nożyczek odcina się płetwę odbytową lub grzbietową każdej ryby i umieszcza w probówce wypełnionej 100 µl ekstrakcyjnego roztworu buforowego 1 (szczegółowe informacje dotyczące przygotowania roztworu buforowego podano poniżej). Nożyczki po każdej rybie myje się do czysta w zlewce wypełnionej destylowaną H_2O i osusza bibułą.

2. Następnie tkankę płetw poddaje się homogenizacji w probówce Eppendorfa za pomocą teflonowego tłuczka do lizy komórek. Do każdej probówki stosuje się nowy tłuczek, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia. Tłuczki umieszcza się na noc w 0,5 M roztworze NaOH, płucze przez 5 minut w destylowanej H_2O i przechowuje w etanolu lub w stanie sterylnym po sterylizacji w autoklawie do czasu kolejnego użycia.

3. Możliwe jest również przechowywanie tkanki płetwy bez ekstrakcyjnego roztworu buforowego 1 na suchym lodzie, a następnie w chłodziarkach w temperaturze – 80 °C, aby zapobiec degeneracji DNA. Ekstrakcja przebiega jednak w skuteczniejszy sposób, jeżeli w tym samym czasie przeprowadza się ekstrakcję DNA (postępowanie zob. powyżej; po przechowywaniu w temperaturze – 80 °C próbki należy rozmrozić na lodzie, zanim wypełni się probówki roztworem buforowym).

4. Po poddaniu homogenizacji wszystkie probówki umieszcza się w łaźni wodnej i gotuje przez 15 minut w temperaturze 100 °C.

5. Następnie do każdej probówki wkrapla się 100 µl roztworu buforowego 2 (szczegółowe informacje dotyczące przygotowania podano poniżej). Próbki pozostawia się w temperaturze pokojowej na 15 minut, od czasu do czasu delikatnie wstrząsając ręcznie.

6. Następnie wszystkie probówki ponownie umieszcza się w łaźni wodnej i gotuje przez kolejne 15 minut w temperaturze 100 °C.

7. Do czasu kolejnej analizy probówki zamraża się w temperaturze – 20 °C.

Przygotowanie roztworu buforowego

Roztwór buforowy 1 stosowany w metodzie PCR:

500 mg N-Lauroylsarcosine (np. Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5M NaCl

dodać 100 ml wody destylowanej

→ autoklaw

Roztwór buforowy 2 stosowany w metodzie PCR:

20 g Chelex (np. Biorad, Munich, GE)

doprowadzić do spęcznienia w 100 ml wody destylowanej

→ autoklaw

Określanie płci genetycznej (metodą PCR) w przypadku ryżanki (przygotowane przez Laboratory for Aquatic Organisms of Bayer CropScience AG i Universität Würzburg Biozentrum)

Przygotowane i zamrożone probówki (opisane w poprzedniej części) rozmraża się na lodzie. Następnie odwirowuje się je wykorzystując wirówkę Eppendorfa (30 sekund przy maksymalnej prędkości w temperaturze pokojowej). W przypadku metody PCR wykorzystuje się czysty supernatant oddzielony od osadu. Nie wolno pod żadnym pozorem dopuścić do przeniesienia jakichkolwiek śladowych ilości Chelexu (znajdującego się w osadzie) do reakcji PCR, ponieważ mogłoby to zakłócić działanie polimerazy Taq. Supernatant wykorzystuje się bezpośrednio lub przechowuje zamrożony (w temperaturze – 20 °C) i ponownie rozmraża do późniejszej analizy w kilku cyklach bez negatywnego wpływu na DNA.

▼**M6**

1. *Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej (25 µl na próbkę):*

	Objętość	Końcowe stężenie
Wzorzec DNA	0,5 µl–2 µl	
10x roztwór buforowy PCR z $MgCl_2$	2,5 µl	1x
Nukleotydy (każdy z serii dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 µM)	200 µM
Primer lewy (10 µM) (zob. poniżej 3–5)	0,5µl	200 µM
Primer prawy (10 µM) (zob. poniżej 3–5)	0,5µl	200 µM
Sulfotlenek dimetylowy	1,25 µl	5 %
Woda (klasy PCR)	do 25 µl	
E-Polimeraza Taq	0,3 µl	1,5 U
10xroztwór buforowy z $MgCl_2$: 670 µM Tris/HCl (pH 8,8 w temperaturze 25 °C), 160 µM $(NH_4)_2SO_4$, 25 µM $MgCl_2$, 0,1-procentowy roztwór Tween 20		

W odniesieniu do każdej PCR (zob. poniżej 3–5) niezbędny jest specjalny starter jako nowe połączenie mieszaniny reakcyjnej i odpowiednich niezbędnych ilości wzorca DNA dla każdej próbki (zob. powyżej). Odpowiednie ilości przenosi się do nowych probówek za pomocą pipet. Następnie wszystkie probówki zamyka się, a ich zawartość miesza (przez około 10 sekund) i odwirowuje (10 sekund w temperaturze pokojowej). Następnie można uruchomić odpowiednie programy PCR. Dodatkowo w każdym programie PCR stosuje się dodatnią próbę kontrolną (przykładowa próbka DNA o znanej aktywności i wyraźnych wynikach) oraz ujemną próbę kontrolną (1 µl wody destylowanej).

2. *Przygotowanie żelu agarozowego (1 %) – podczas przeprowadzania programów PCR:*

— rozpuścić 3 g agarozy w 300 ml 1 × roztworu buforowego TAE (1 % żel agarozowy)

— roztwór gotować w kuchence mikrofalowej (przez około 2–3 min.)

— przelać gorący roztwór do specjalnego pojemnika odlewniczego umieszczonego na lodzie

— po około 20 min. żel agarozowy jest gotowy do użycia.

— przechowywać żel agarozowy w 1 × roztworu buforowego TAE do końca programów PCR.

3. *Program PCR z udziałem aktyny:*

Ta reakcja PCR ma na celu wykazanie, że DNA w próbce nie jest uszkodzone.

— Specjalny starter:

„Mact1(górny/lewy)” TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(dolny/prawy)” GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Program:

5 min. w temperaturze 95 °C

Cykl (35-krotny):

Denaturacja	→ 45 sekund w temperaturze 95 °C
Hybrydyzacja	→ 45 sekund w temperaturze 56 °C
Wydłużenie	→ 1 min. w temperaturze 68 °C

15 min. w temperaturze 68 °C

▼M6

4. *Program PCR z udziałem genów X i Y:*

W tej serii programu PCR zastosowane zostaną próbki z nieuszkodzonym DNA w celu wykrycia genów X i Y. Męskie DNA powinno zawierać jedną podwójną nić, a żeńskie DNA jedną pojedynczą (po barwieniu i elektroforezie w żelu). W tej serii programu należy uwzględnić jedną dodatnią próbę kontrolną dla samców (próbka XY) i jedną dla samic (próbka XX).

— Specjalny starter:

„PG 17.5” (górny/lewy) CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17.6” (dolny/prawy) GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

5 min. w temperaturze 95 °C

Cykl (40-krotny):

Denaturacja	→ 45 sekund w temperaturze 95 °C
Hybrydyzacja	→ 45 sekund w temperaturze 55 °C
Wydłużenie	→ 1 min. 30 sekund w temperaturze 68 °C

15 min. w temperaturze 68 °C

5. *Program PCR z udziałem genu Y jako próba kontrolna dla programu PCR z udziałem genów Y i X:*

Ten program PCR pozwala zweryfikować wyniki „programu PCR z udziałem genu X i Y”. Próbki „męskie” powinny zawierać jedną nić, a próbki „żeńskie” żadnej (po barwieniu i elektroforezie w żelu).

— Specjalny starter:

„DMTYa (górny/lewy)” GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (dolny/prawy)” TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

5 min. w temperaturze 95 °C

Cykl (40-krotny):

Denaturacja	→ 45 sekund w temperaturze 95 °C
Hybrydyzacja	→ 45 sekund w temperaturze 56 °C
Wydłużenie	→ 1 min. w temperaturze 68 °C

15 min. w temperaturze 68 °C

6. *Barwienie próbek PCR:*

Roztwór barwiący:

50 % glicerolu

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % błękitu bromofenolowego

0,25 % ksylenocyjanolu

Wprowadzić za pomocą pipety 1 µl roztworu barwiącego do każdej pojedynczej probówki.

7. *Rozpocząć elektroforezę na żelu:*

— sporządzony 1 % żel agarozowy przenosi się do komory elektroforezy na żelu wypełnionej 1 × buforem TAE;

— do szczeliny w żelu agarozowym wprowadza się za pomocą pipety 10–15 µl każdej z zabarwionych próbek PCR;

— do oddzielnej szczeliny wprowadza się za pomocą pipety również 5–15 µl zestawu 1kb-„Ladder” (firma Invitrogen);

— Rozpocząć elektroforezę doprowadzając napięcie 200 V.

— Zakończyć po 30–45 min.

▼**M6**

8. *Oznaczenie nici*

— Wyczyścić żel agarozowy w wodzie destylowanej.

— Następnie przenieść żel agarozowy na 15–30 min. do bromku etydyny.

— Następnie należy wykonać zdjęcie żelu agarozowego w komorze z oświetleniem UV.

— Ponadto próbki analizuje się, porównując je z nicią (lub nićmi) dodatniej próby kontrolnej i drabinką.

▼M6

Dodatek 10

Wytyczne dotyczące pobierania próbek tkanek w celu określenia płci genetycznej metodą PCR w przypadku ciernika

Pobieranie próbek i ekstrakcja DNA

Ekstrakcję DNA można przeprowadzić wykorzystując różnorodne dostępne na rynku odczynniki oraz systemy ekstrakcji ręcznej lub automatycznej. Poniżej opisano protokół stosowany w laboratorium Cefas Weymouth, a w stosowanych przypadkach dodano metody alternatywne.

1. Za pomocą małych nożyczek z części grzbietowo-bocznej (po usunięciu głowy i ogona do analizy VTG) każdej ryby pobiera się mały fragment tkanki (10–20 mg). Tkankę umieszcza się w probówce i zanurza albo bezpośrednio w ciekłym azocie (do przechowywania w temperaturze – 80 °C), albo wypełnia roztworem 70 % etanolu (do transportu i późniejszego przechowywania w temperaturze 4 °C). Nożyczki myje się do czysta po każdej rybie w roztworze 70 % etanolu, a następnie w wodzie destylowanej i osusza bibułą.

2. Etanol (jeżeli jest obecny) usuwa się przez aspirację, a tkankę ekstrahuje się całą noc w obecności proteinazy K w 400 µl roztworu buforowego ATL (Qiagen). Podwielokrotność (200 µl) roztworu przenosi się do 96-dołkowego bloku S (Qiagen) i ekstrahuje DNA w formacie 96-dołkowym z wykorzystaniem zestawu Qiagen Universal BioRobot i QIamp Investigator BioRobot. DNA wymywa się w 50 µl wody wolnej od deoksyrybonukleazy i rybonukleazy. W przypadku wykorzystania twardych tkanek (takich jak kręgosłup lub płetwa piersiowa) do ekstrakcji DNA konieczna może być homogenizacja próbki w roztworze buforowym do lizy za pomocą aparatu FastPrep® lub równoważnego systemu rozbijania tkanek.

   Alternatywnie

   a) tkankę ekstrahuje się całą noc w obecności proteinazy K w 400 µl roztworu buforowego do lizy G2 (Qiagen) i ekstrahuje się DNA z 200 µl ekstraktu za pomocą zestawu EZ-1 DNA easy tissue i biorobota EZ-1 lub zestawu DNA easy mini tissue. DNA wymywa się w 50 µl objętości;

   b) tkanki przetwarza się przy zastosowaniu odczynnika DNAzol. Jednym słowem próbki tkanek poddaje się procesowi lizy w 1ml odczynnika DNAzol przez 10 minut w 1,5 ml mikropróbówce do wirówki, a następnie odwirowuje z prędkością 13 000 obr./min. przez 5 minut w celu oddzielenia cząstek stałych. Po procesie lizy próbkę przenosi się do nowej mikropróbówki o pojemności 1,5 ml, zawierającej 500 µl 100 % etanolu do biologii molekularnej, a następnie odwirowuje z prędkością 13 000 obr./min. przez 10 minut w celu strącenia DNA. Etanol usuwa się i zastępuje 400 µl roztworu 70 % etanolu do biologii molekularnej, odwirowuje z prędkością 13 000 obr./min. przez 5 minut, a osad DNA rozpuszcza się w 50 µl wody wolnej od cząsteczkowej deoksyrybonukleazy i rybonukleazy. Podobnie jak poprzednio w przypadku wykorzystania twardych tkanek (płetwa piersiowa) przed ekstrakcją DNA konieczna może być homogenizacja próbki w roztworze buforowym do lizy za pomocą aparatu FastPrep® lub równoważnego systemu rozbijania tkanek.

3. DNA przechowuje się w temperaturze – 20 °C do czasu aż będzie potrzebne.*Ważna uwaga:* podczas tego procesu należy używać rękawiczek.

Analiza łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)

Amplifikacje zostały wykonane przy użyciu 2,5 µl ekstraktu DNA w 50 µl objętości reakcyjnej z wykorzystaniem starterów Idh locus (jak opisał Peichel i in., 2004. Current Biology 1:1416-1424):

Starter lewy	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Starter prawy	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼M6

Istnieje szereg dostawców odpowiednich odczynników PCR. Opisana poniżej metoda jest obecnie stosowana w laboratorium Cefas Weymouth.

1. *Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej (50 µl na próbkę):*

Mieszaninę główną sporządza się w opisany poniżej sposób. Można ją przygotować z wyprzedzeniem i przechowywać zamrożoną w temperaturze – 20 °C do czasu wykorzystania. Sporządzić wystarczającą ilość mieszaniny głównej na potrzeby ujemnej próby kontrolnej (tylko woda do biologii molekularnej).

	Objętość (podstawowe stężenie)/ próbkę	Końcowe stężenie
5x roztwór buforowy do reakcji GoTaq®	10 µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 µM)	2,5 µM
Nukleotydy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 µM każda)	250 µM każda
Starter lewy	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Starter prawy	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Woda do biologii molekularnej	30,75 µl	
Polimeraza GoTaq	0,25 µl	1,25 U

— Umieścić 47,5 µl w oznakowanej, cienkościennej probówce do PCR o pojemności 0,5 ml.

— Dodać 2,5 µl oczyszczonego DNA do odpowiednio oznakowanej probówki. Powtarzać tę czynność w odniesieniu do wszystkich próbek i ujemnych prób kontrolnych.

— Wlać 2 krople oleju mineralnego. Ewentualnie użyć termocyklera z podgrzewaną pokrywą.

— Zamknąć pokrywki.

— Próbki poddano denaturacji w termocyklerze Peltiera PTC-225 w temperaturze 94 ± 2 °C przez 5 minut, następnie 39 cyklom w temperaturze 94 ± 2 °C przez minutę, w temperaturze 55 ± 2 °C przez 1 minutę, w temperaturze 72 ± 2 °C przez 1 minutę i na koniec w temperaturze 72 ± 2 °C przez 10 minut.

2. *Przygotowanie żelu agarozowego (2 %):*

Tradycyjnie produkty PCR rozpuszcza się na 20 % żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny.

Wykorzystać można również systemy elektroforezy kapilarnej.

— Zważyć 2 g agarozy w 100 ml 1 × roztworu buforowego TAE.

— Podgrzać w kuchence mikrofalowej (około 2–3 min.), aby rozpuścić agarozę.

— Dodać 2 krople bromku etydyny o stężeniu końcowym 0,5 µg/ml.

— Przenieść gorący roztwór do urządzenia do wylewania żelu.

— Pozostawić żel do zastygnięcia.

3. *Elektroforeza żelowa:*

— Przenieść żel agarozowy do urządzenia do elektroforezy i zatopić w 1 × roztworze buforowym TAE.

— Wprowadzić 20 µl każdej z próbek do oddzielnego dołka, dodając marker masy cząsteczkowej (100 bp DNA ladder, Promega) do zapasowego dołka.

— Elektroforezę przeprowadza się pod napięciem 120 V przez 30–45 minut.

▼**M6**

4. *Wizualizacja produktów amplifikacji*

Jeżeli bromek etydyny został wprowadzony do żelu agarozowego, jak opisano powyżej, produkty DNA można zobrazować w źródle promieni UV. Można również zabarwić żel agarozowy pokrywając żel rozcieńczonym roztworem bromku etydyny (0,5 μg/ml w wodzie) na 30 minut przed wizualizacją.

▼M6

Dodatek 11

Wytyczne dotyczące procedury sztucznego zapłodnienia w odniesieniu do ciernika

Celem niniejszej części jest opisanie procedur pozyskiwania zapłodnionych komórek jajowych od ciernika w celu wykorzystania ich do badania rozwoju płciowego ryb.

Procedury

Pozyskanie spermy od samców

1. Dobrze wybarwiony samiec z żądanej populacji jest uśmiercany.

2. Z każdej strony ryby wycina się jądra. *Jądra są z reguły mocno ubarwionymi, podłużnymi organami dobrze widocznymi na bocznej środkowej linii ciała*. Zastosować jedną z poniższych metod:

3. Za pomocą małych nożyczek wykonać pojedyncze nacięcie o długości 1–1,5 cm, biegnące od odbytu pod kątem około 45 stopni.

4. Użyć skalpela w celu wykonania małego nacięcia z boku ryby nieco za miednicą od strony brzucha w stosunku do łusek na bokach.

5. Jądra usuwa się za pomocą małej pęsety i umieszcza na płytce Petriego.

6. Każdej jądro pokrywa się 100 µl świeżo sporządzonego **końcowego roztworu Hanka** (*).

7. Jądra kroi się w drobną kostkę za pomocą żyletki lub skalpela. Pozwala to uwolnić spermę, która nada roztworowi Hanka mleczny kolor.

8. Płyn zawierający spermę dodaje się do probówki, jednocześnie starając się nie dodać podczas wkraplania żadnego kawałka tkanki jąder.

9. Do probówki dodaje się 800 µl końcowego roztworu Hanka i dokładnie miesza.

10. W razie potrzeby samca można zakonserwować poprzez utrwalenie w roztworze 100 % etanolu lub innej pożądanej substancji utrwalającej. Jest to szczególnie ważne, jeżeli w badaniu potomstwo przypisuje się danym rodzicom.

Ważna uwaga: *chociaż większość niezbędnych roztworów podstawowych można przygotować wcześniej,* ***roztwór podstawowy 5****, i w związku z tym* ***roztwór końcowy****, należy sporządzić świeżo w dniu, w którym mają zostać wykorzystane.*

Roztwór podstawowy 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Woda destylowana	100 ml

Roztwór podstawowy 2

Na_2HPO_4 (bezwodny)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
Woda destylowana	100 ml

Roztwór podstawowy 3

$CaCl_2$	0,72 g
Woda destylowana	50 ml

(*) Buforowany roztwór soli Hanka (HBSS):

HBSS jest niezbędny do konserwacji spermy podczas przygotowywania do zapłodnienia.

▼M6

Roztwór podstawowy 4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
Woda destylowana	50 ml

Roztwór podstawowy 5 (świeżo sporządzony)

$NaHCO_3$	0,35 g
Woda destylowana	10 ml

Uwaga: jeżeli niektóre z powyższych soli są już w posiadaniu laboratorium, ale mają inną zwartość wody (tj. $2H_2O$ zamiast bezwodników), można ich nadal używać, ale najpierw należy skorygować masę na podstawie masy cząsteczkowej).

W celu uzyskania końcowego roztworu Hanka połączyć ze sobą w następującej kolejności:

roztwór podstawowy 1	1,0 ml
roztwór podstawowy 2	0,1 ml
roztwór podstawowy 3	0,1 ml
Woda destylowana	8,6 ml
roztwór podstawowy 4	0,1 ml
roztwór podstawowy 5	0,1 ml

Dokładnie wymieszać przed użyciem.

Zapłodnienie

1. Z żądanej populacji wybiera się duże, ciężarne samice; samice są gotowe do wyciśnięcia komórek jajowych tylko w przypadku, gdy komórki jajowe wystają w sposób widoczny z kloaki. Gotowe samice przyjmują charakterystyczną pozycję z głową w górze.

2. Delikatnie przesunąć palec lub kciuk po boku ryby w dół w kierunku ogona, aby sprowokować wypuszczenie torebki z komórkami jajowymi na świeżą płytkę Petriego. Powtórzyć tę samą czynność po drugiej stronie i włożyć rybę z powrotem do jej zbiornika.

3. Komórki jajowe można rozprowadzić (tak aby utworzyły pojedynczą warstwę) za pomocą delikatnego pędzelka. Ważne jest, aby wystawić na działanie spermy jak najwięcej komórek jajowych, więc wskazane jest maksymalne zwiększenie powierzchni ikry. Ważna uwaga: ułożyć wokół komórek jajowych wilgotną tkaninę, aby cały czas były wilgotne (ważne jest, aby komórki jajowe nie stykały się bezpośrednio z wodą, ponieważ może to doprowadzić do przedwczesnego utwardzenia kosmówki, co uniemożliwi zapłodnienie). Poszczególne samice mogą produkować różną liczbę komórek jajowych, ale z pojedynczej ciężarnej samicy można z łatwością uzyskać przeciętnie około 150 komórek jajowych.

4. Po całej powierzchni komórek jajowych rozprowadza się równomiernie za pomocą pędzla 25 µl spermy umieszczonej w mieszaninie Hanka. Z chwilą rozpoczęcia procesu zapłodnienia komórki jajowe szybko twardnieją i zmieniają kolor (w ciągu minuty). Jeżeli szacowana liczba komórek jajowych wynosi więcej niż 150, powtórzyć procedurę. Również w przypadku gdy komórki jajowe nie stwardnieją w ciągu minuty, należy dodać jeszcze trochę spermy. Ważna uwaga: dodanie większej ilości spermy niekoniecznie poprawia wskaźnik zapłodnienia.

5. Komórki jajowe i roztwór spermy należy pozostawić w celu „interakcji” na co najmniej 15 minut, a zapłodnione komórki jajowe należy umieścić w akwariach do narażenia w ciągu 1,5 godziny od zapłodnienia.

6. Proces ten powtarza się z wykorzystaniem kolejnej samicy do momentu zebrania żądanej liczby komórek jajowych.

7. Zachować kilka komórek jajowych z ostatniej partii i utrwalić je w roztworze 10 % kwasu octowego.

▼M6

Liczenie i rozdzielanie komórek jajowych na akwaria badawcze

1. Komórki jajowe należy równomiernie rozdzielać na każdym poziomie zabiegowym w celu uniknięcia genetycznego błędu systematycznego. Każdą partię zapłodnionych komórek jajowych należy podzielić na równe grupy (tyle, ile poziomów zabiegowych) za pomocą tępego narzędzia (szeroka pęseta entomologiczna lub pętla do inokulacji). Jeżeli zamierza się zastosować 4 kontrpróby na każdy zabieg, z 20 komórkami jajowymi w każdej kontrpróbie, wówczas należy rozdzielić 80 komórek jajowych na akwaria do badania narażenia. Ważna uwaga: zaleca się dodanie dodatkowych 20 % (tj. 96 komórek jajowych na każdy poziom zabiegowy), aż do momentu pewności uzyskania 100 % wskaźników zapłodnienia.

2. Komórki jajowe ciernika są bardzo podatne na infekcje grzybicze poza obrębem gniazda chronionego przez ojca. Z tego względu kluczowe znaczenie ma poddanie wszystkich komórek jajowych działaniu błękitu metylenowego w ciągu pierwszych pięciu dni badania. Podstawowy roztwór błękitu metylenowego sporządza się w stężeniu 1 mg/ml i dodaje do akwariów badawczych, aby zapewnić maksymalne końcowe stężenie wynoszące 2,125 mg/l. Ważna uwaga: cierniki nie powinny być narażone na działanie błękitu metylenowego po wylęgu, więc 6. dnia system powinien być wolny od błękitu metylenowego.

3. Komórki jajowe kontroluje się codziennie i odnotowuje się wszystkie martwe lub niezapłodnione komórki jajowe. Ważna uwaga: do momentu wyklucia komórki jajowe nie powinny w żadnym wypadku znaleźć się poza wodą nawet na bardzo krótkie okresy.

▼M6

C.42. BIODEGRADOWALNOŚĆ W WODZIE MORSKIEJ

OGÓLNE WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 306 (1992 r.) w sprawie badań. Gdy opracowywano oryginalne metody badawcze, nie było wiadomo, do jakiego stopnia można byłoby zastosować do środowiska morskiego wyniki badań przesiewowych dotyczących szybkiej biodegradowalności z wykorzystaniem wody słodkiej i ścieków oczyszczonych lub osadu czynnego jako inokulum. Zgłaszano zróżnicowane wyniki w tej kwestii (np. (1)).

2. Do morza dociera wiele rodzajów ścieków przemysłowych zawierających różne substancje chemiczne, w wyniku bezpośrednich zrzutów albo przez ujścia rzek i rzeki, w przypadku których czas zalegania jest krótki w porównaniu z okresem niezbędnym dla całkowitej biodegradacji wielu występujących w nich substancji chemicznych. Ze względu na rosnącą świadomość potrzeby ochrony środowiska morskiego przed wzrastającym obciążeniem substancjami chemicznymi oraz konieczność oszacowania prawdopodobnego stężenia substancji chemicznych w morzu opracowano metody badawcze dotyczące biodegradowalności w wodzie morskiej.

3. W przypadku metod opisanych w niniejszym dokumencie naturalną wodę morską wykorzystywano jako fazę wodną i jako źródło mikroorganizmów. Podczas prób mających na celu potwierdzenie możliwości zastosowania metod szybkiej biodegradowalności w wodzie słodkiej badano możliwość wykorzystania wody morskiej poddanej ultrafiltracji i odwirowaniu oraz osadów morskich jako inokulum. Badania te zakończyły się niepowodzeniem. W związku z tym środowiskiem badania jest naturalna woda morska poddana wstępnemu oczyszczaniu w celu usunięcia cząstek gruboziarnistych.

4. W celu oceny ostatecznej biodegradowalności przy użyciu metody wytrząsania w kolbie należy zastosować stosunkowo wysokie stężenia badanej substancji ze względu na niską czułość metody analitycznej z rozpuszczonym węglem organicznym. To z kolei wymaga dodania do wody morskiej mineralnych składników odżywczych (N i P), których niskie stężenia mogłyby w przeciwnym razie ograniczyć usuwanie rozpuszczonego węgla organicznego. Również w przypadku metody „zamkniętej butli” konieczne jest dodanie składników odżywczych ze względu na stężenie dodanej badanej substancji.

5. W związku z tym metody nie są badaniami szybkiej biodegradowalności, ponieważ nie dodaje się żadnego inokulum w celu uzupełnienia mikroorganizmów już obecnych już w wodzie morskiej. Badania nie symulują również warunków panujących w środowisku morskim, ponieważ dodaje się składniki odżywcze, a stężenie badanej substancji jest dużo wyższe niż byłoby w morzu. Z tych względów metody te przedstawiono w nowym punkcie „Biodegradowalność w wodzie morskiej”.

ZASTOSOWANIE

6. Wyniki badań, które zostałyby zastosowane, ponieważ wzorzec stosowania i usuwania substancji, o których mowa, wskazywał drogę do morza, dostarczają pierwszych informacji dotyczących biodegradowalności w wodzie morskiej. Jeżeli wynik jest pozytywny (> 70 % usuniętego rozpuszczonego węgla organicznego; > 60 % teoretycznego zapotrzebowanie na tlen (TZT)), można stwierdzić, że istnieje potencjał dla biodegradacji w środowisku morskim. Ujemny wynik nie wyklucza jednak istnienia takiego potencjału, ale wskazuje na konieczność przeprowadzenia dodatkowych badań, np. z zastosowaniem jak najniższego stężenia badanej substancji.

▼M6

7. W obydwu przypadkach, jeżeli wymagana jest bardziej konkretna wartość w odniesieniu do tempa lub stopnia biodegradacji w wodach morskich w danym miejscu, należałoby zastosować bardziej złożone i wyrafinowane, a zatem bardziej kosztowne metody. Na przykład badanie symulacyjne przeprowadzić można z zastosowaniem stężenia badanej substancji bardziej zbliżonego do prawdopodobnego stężenia w środowisku. Wykorzystać można również niewzbogaconą, nieoczyszczoną wstępnie wodę morską pobraną z lokalizacji będącej przedmiotem zainteresowania i po wstępnej biodegradacji przeprowadzić szczegółową analizę chemiczną. W przypadku ostatecznej biodegradowalności konieczne byłoby zastosowanie substancji oznakowanych ^{14}C, aby można było zmierzyć wskaźniki znikania rozpuszczalnego organicznego ^{14}C i wytwarzania $^{14}CO_2$ w warunkach rzeczywistych stężeń.

WYBÓR METOD

8. Wybór metody, którą należy zastosować, zależy od szeregu czynników; poniższa tabela ma służyć jako pomoc w wyborze metody. Chociaż substancji, których rozpuszczalność w wodzie jest niższa od wartości równoważnej około 5 mg C/l, nie można zbadać metodą wytrząsania w kolbie, słabo rozpuszczalne substancje można zasadniczo poddać przynajmniej badaniu metodą „zamkniętej butli”.

Tabela

Zalety i wady metody wytrząsania w kolbie i metody „zamkniętej butli”.

METODA	ZALETY	WADY
WYTRZĄSANIE W KOLBIE	— prosta aparatura, z wyjątkiem analizatora węgla — czas trwania 60 dni nie stanowi problemu — brak interferencji w związku z nitryfikacją — można ją dostosować do substancji lotnych	— wymagany jest analizator węgla — wykorzystanie 5–40 mg rozpuszczonego węgla organicznego/1, może wykazywać działanie hamujące — oznaczenie rozpuszczonego węgla organicznego jest trudne w przypadku jego niskich stężeń w wodzie morskiej (wpływ chlorku) — zawartość rozpuszczonego węgla organicznego jest czasami wysoka w wodzie morskiej
ZAMKNIĘTA BUTLA	— prosta aparatura — łatwe końcowe określenie — stosowane jest niskie stężenie badanej substancji (2 mg/l), w związku z tym mniejsze jest prawdopodobieństwo zahamowania — łatwo można ją dostosować do substancji lotnych	— możliwe trudności z utrzymaniem szczelności butelek — rozwój bakterii na ściankach może prowadzić do fałszywych wartości — wartości absorpcji O_2 w ślepych próbach mogą być wysokie, szczególnie po 28 dniach; można sobie z tym poradzić dzięki starzeniu wody morskiej — możliwa interferencja w związku z pobieraniem O_2 w procesie nitryfikacji

METODA WYTRZĄSANIA W KOLBIE

WPROWADZENIE

1. Metoda ta stanowi wariant zmodyfikowanego badania przesiewowego OECD dla wody morskiej, opisanego w rozdziale C.4B niniejszego załącznika (2). Prace nad metodą zostały ukończone w wyniku badania międzylaboratoryjnego zorganizowanego dla Komisji Europejskiej przez Danish Water Quality Institute (3).

2. Podobnie jak w przypadku badania wody morskiej metodą „zamkniętej butli”, wyniki tego badania nie mają zostać przyjęte jako wskaźniki szybkiej biodegradowalności, ale mają być konkretnie wykorzystywane do uzyskania informacji na temat biodegradowalności substancji w środowiskach morskich.

▼M6

ZASADA METODY

3. Określoną uprzednio ilość badanej substancji rozpuszcza się w środowisku badania, tak aby uzyskać stężenie 5–40 mg rozpuszczonego węgla organicznego (DOC)/l. Jeżeli granice wrażliwości analiz węgla organicznego uległy poprawie, korzystne może być wykorzystanie niższych stężeń badanych substancji, w szczególności substancji hamujących. Roztwór badanej substancji w środowisku badania jest inkubowany w warunkach mieszania, bez dostępu światła lub w rozproszonym świetle w warunkach aerobowych w stałej temperaturze (regulowanej z dokładnością do ± 2 °C), która zazwyczaj mieści się w przedziale 15–20 °C. W przypadku gdy celem badania jest symulowanie sytuacji środowiskowych, można prowadzić badania poza powyższym normalnym zakresem temperatury. Zalecany maksymalny czas trwania badania wynosi około 60 dni. Po degradacji mierzy się zawartość rozpuszczonego węgla organicznego (degradacja ostateczna), a w niektórych przypadkach dokonuje szczegółowej analizy (degradacja pierwotna).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI

4. Aby stwierdzić, czy badanie może zostać zastosowane w odniesieniu do konkretnej substancji, muszą być znane jej niektóre właściwości. Należy ustalić poziom zawartości węgla organicznego w substancji, lotność substancji musi uniemożliwiać znaczące straty substancji w trakcie badania, a jej rozpuszczalność w wodzie powinna być większa niż ekwiwalent 25–40 mg C/l. Ponadto badana substancja nie powinna ulegać znaczącej adsorpcji na powierzchniach szklanych. Wymagane są informacje na temat czystości lub względnych proporcji głównych składników badanej substancji, aby można było zinterpretować uzyskane wyniki, zwłaszcza gdy wynik jest zbliżony do poziomu akceptacji.

5. Informacje na temat toksyczności badanej substancji w stosunku do bakterii, mierzonej na przykład w krótkoterminowych badaniach szybkości oddychania (4), mogą być pomocne w wyborze odpowiednich badanych stężeń i mogą mieć zasadnicze znaczenie dla prawidłowej interpretacji niskich wartości biodegradacji. Informacje takie nie zawsze jednak wystarczą, aby dokonać interpretacji wyników uzyskanych w badaniu biodegradacji, więc procedura opisana w pkt 18 jest bardziej odpowiednia.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

6. W celu sprawdzenia aktywności mikroorganizmów w próbce wody morskiej należy zastosować właściwe substancje odniesienia. Przykładami substancji, których można użyć do tego celu, są benzoesan sodu, octan sodu i anilina. Substancje odniesienia muszą ulec rozkładowi w odpowiednio krótkim czasie, w przeciwnym razie zaleca się powtórzenie badania z wykorzystaniem innej próbki wody morskiej.

7. W badaniu międzylaboratoryjnym KE, w którym próbki wody morskiej pobierano z różnych lokalizacji i o różnych porach roku (3), faza zwłoki (t_L) i czas potrzebny do 50 % degradacji (t_{50}), z wyłączeniem fazy zwłoki, w przypadku benzoesanu sodu wynosiły odpowiednio 1–4 dni i 1–7 dni. W przypadku aniliny, t_L wynosił 0–10 dni, zaś t_{50} wynosił 1–10 dni.

ODTWARZALNOŚĆ I CZUŁOŚĆ METODY

8. Odtwarzalność metody ustalono w badaniu międzylaboratoryjnym (3). Najniższe stężenie badanej substancji, w przypadku którego można zastosować tę metodę z analizą rozpuszczonego węgla organicznego, jest w dużej mierze wyznaczone granicą wykrywalności analizy węgla organicznego (obecnie około 0,5 mg C/l) i stężeniem węgla organicznego rozpuszczonego w wodzie morskiej (zwykle rzędu 3–5 mg/l w przypadku wody z otwartego morza). Po dodaniu badanej substancji stężenie tła rozpuszczonego węgla organicznego nie powinno przekroczyć około 20 % całkowitego stężenia rozpuszczonego węgla organicznego. Jeżeli nie jest to wykonalne, stężenie

▼M6

tła rozpuszczonego węgla organicznego można czasem zredukować, postarzając wodę morską przed badaniem. Jeżeli metodę tę stosuje się tylko ze szczegółową analizą chemiczną (umożliwiającą pomiar pierwotnej degradacji), badacz musi udokumentować, czy można oczekiwać ostatecznej degradowalności, dostarczając dodatkowych informacji. Te dodatkowe informacje mogą obejmować wyniki innych badań dotyczących szybkiej lub naturalnej biodegradowalności.

OPIS METODY

Aparatura

9. Zwykła aparatura laboratoryjna oraz:

   a. wytrząsarka, w której mieszczą się kolby Erlenmeyera o pojemności 0,5–2 litrów, z automatyczną kontrolą temperatury lub stosowana w stałej temperaturze pokojowej 15–20 °C regulowanej z dokładnością ± 2 °C;

   b. kolby Erlenmeyera z wąską szyjką o pojemności 0,5–2 litra;

   c. aparat do filtracji membranowej lub wirówka;

   d. filtry membranowe, 0,2–0,45 μm;

   e. analizator węgla;

   f. urządzenia do szczegółowej analizy (nieobowiązkowe).

Woda morska

10. Próbkę wody morskiej należy pobrać do dokładnie oczyszczonego pojemnika i przetransportować do laboratorium, najlepiej w ciągu jednego lub dwóch dni od pobrania próbki. Podczas transportu nie wolno dopuścić, aby temperatura próbki znacząco przekroczyła temperaturę, w której będzie prowadzone badanie. Należy dokładnie zidentyfikować miejsce próbkowania i opisać je pod względem poziomu zanieczyszczenia i składników odżywczych. W szczególności w przypadku wód przybrzeżnych lub zanieczyszczonych należy uwzględnić w tej charakterystyce liczbę kolonii drobnoustrojów cudzożywnych i określenie stężeń rozpuszczonych azotanów, związków amonu i fosforanów.

11. W odniesieniu do samej próbki wody morskiej należy podać następujące informacje:

   — data pobrania;

   — głębokość pobrania;

   — wygląd próbki – mętna itd.;

   — temperatura w czasie pobrania;

   — zasolenie;

   — rozpuszczony węgiel organiczny;

   — upływ czasu między pobraniem a wykorzystaniem w badaniu.

12. Jeżeli stwierdzone zostanie, że zawartość rozpuszczonego węgla organicznego w wodzie morskiej jest wysoka (pkt 8), zaleca się starzenie wody morskiej co najmniej przez tydzień przed jej wykorzystaniem w badaniu. Woda powinna być przechowywana w warunkach tlenowych w temperaturze badania i bez dostępu światła lub w rozproszonym świetle. W razie potrzeby należy utrzymać warunki tlenowe zapewniając delikatne napowietrzanie. Podczas starzenia wody zmniejsza się zawartość łatwo rozkładających się substancji organicznych. W badaniu międzylaboratoryjnym (3) nie wykazano

▼M6

żadnej różnicy między potencjałem degradacji postarzonych próbek wody morskiej i świeżo pobranych próbek. Przed użyciem wodę morską należy wstępnie oczyścić, usuwając duże cząstki, np. filtrując na filtrze nylonowym albo zgrubnym filtrze papierowym (nie stosować filtrów membranowych ani filtrów GF/C) lub w drodze sedymentacji i dekantacji. W sprawozdaniu należy podać zastosowaną procedurę. Wstępne oczyszczanie należy przeprowadzić po starzeniu wody, jeżeli poddano ją temu procesowi.

Roztwory podstawowe dla mineralnych składników odżywczych

13. Należy przygotować następujące roztwory podstawowe, stosując odczynniki do analiz:

a) Diwodoroortofosforan potasu, KH_2PO_4 8,50 g

Monowodoroortofosforan dipotasu, K_2HPO4 21,75 g

Dwuwodny wodoroortofosforan disodu, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,30 g

Chlorek amonu, NH_4Cl 0,50 g

Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.

b) Chlorek wapnia, $CaCl_2$ 27,50 g

Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.

c) Siedmiowodny siarczan magnezu, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.

d) Sześciowodny chlorek żelaza (III), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.

Można uniknąć strącania w roztworze (d), dodając jedną kroplę stężonego HCl albo 0,4 g kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA, sól dwusodowa) na litr. Jeżeli w roztworze podstawowym powstanie zawiesina, należy zastąpić go świeżo przygotowanym roztworem.

Przygotowanie środowiska badania

14. Należy dodać 1 ml każdego z powyższych roztworów podstawowych na każdy litr wstępnie oczyszczonej wody morskiej.

Inokulum

15. Nie dodawać konkretnego inokulum w celu uzupełnienia mikroorganizmów już obecnych w wodzie morskiej. Określić (nieobowiązkowo) liczbę organizmów cudzożywnych tworzących kolonie w wodzie morskiej stanowiącej środowisko badania (i najlepiej również w pierwotnych próbkach wody morskiej), np. na podstawie liczby kolonii na agarze morskim. Jest to szczególnie pożądane w przypadku próbek z terenów przybrzeżnych lub zanieczyszczonych. Sprawdzić aktywność mikroorganizmów cudzożywnych w wodzie morskiej, przeprowadzając badanie z substancją odniesienia.

▼M6

Przygotowanie kolb

16. Upewnić się, czy wszystkie szklane naczynia zostały dokładnie wyczyszczone, chociaż niekoniecznie muszą być one sterylne (np. mieszaniną alkoholu i kwasu chlorowodorowego), opłukane i osuszone przed użyciem, aby uniknąć zanieczyszczenia pozostałościami z poprzednich badań. Kolby należy również oczyścić przed pierwszym użyciem.

17. Badane substancje należy ocenić, używając dwóch kolb równocześnie wraz z pojedynczą kolbą na substancję odniesienia. Wykonać podwójną ślepą próbę, nie zawierającą badanej substancji ani substancji odniesienia, w celu oznaczenia ślepych prób do analizy. Rozpuścić badane substancje w środowisku badania – praktycznie jest dodawać je stosując stężony roztwór podstawowy, aby zapewnić pożądane stężenia początkowe wynoszące normalnie 5–40 mg DOC/l. Zwykle należy badać substancję odniesienia przy początkowym stężeniu odpowiadającym 20 mg DOC/l. W przypadku stosowania roztworów podstawowych badanej substancji lub substancji odniesienia należy upewnić się, czy zasolenie użytej do badania wody morskiej nie uległo znacznej zmianie.

18. Jeżeli można spodziewać się skutków toksycznych lub nie można ich wykluczyć, zalecane byłoby włączenie do projektu badania dwukrotnego eksperymentu z zahamowaniem. Dodać badaną substancję i substancję odniesienia do tego samego naczynia, przy czym, aby umożliwić porównanie, stężenie substancji odniesienia normalnie powinno być takie samo jak w próbie kontrolnej (tj. 20 mg DOC/l).

19. Wprowadzić właściwe ilości roztworów do badań do kolbach Erlenmeyera (dogodna ilość wynosi do około połowy objętości kolby), a następnie każdą kolbę przykryć luźną pokrywą (np. folią aluminiową), która umożliwia wymianę gazów między kolbą a otaczającym ją powietrzem. (Tampony z waty nie są odpowiednie w przypadku stosowania analizy rozpuszczonego węgla organicznego). Naczynia należy umieścić w wytrząsarce i wytrząsać w sposób ciągły w wolnym tempie (np. 100 obrotów na minutę) przez cały czas trwania badania. Kontrolować temperaturę (15–20 °C z dokładnością ± 2 °C) oraz chronić naczynie przed światłem, aby uniknąć wzrostu glonów. Upewnić się, czy powietrze jest wolne od toksycznych substancji.

Fizykochemiczna próba kontrolna (nieobowiązkowa)

20. W przypadku gdy zachodzi podejrzenie degradacji abiotycznej lub występowania mechanizmów prowadzących do strat, takich jak hydroliza (problem dotyczy tylko szczegółowej analizy), parowanie lub adsorpcja, zaleca się wykonanie fizykochemicznej próby kontrolnej. Można ją wykonać dodając chlorek rtęci (II) ($HgCl_2$) ([1]) (50–100 mg/l) do naczyń zawierających badaną substancję w celu zatrzymania aktywności mikrobiologicznej. Znaczące obniżenie rozpuszczonego węgla organicznego lub specyficznego stężenia substancji w fizykochemicznym badaniu próby kontrolnej wskazuje na występowanie abiotycznych mechanizmów usuwania. (W przypadku zastosowania chlorku rtęci należy zwrócić uwagę na zakłócenia lub zatrucie katalizatorem w analizie rozpuszczonego węgla organicznego.)

Liczba kolb

21. W typowej analizie stosuje się następujące kolby:

Kolby 1 i 2 zawierające badaną substancję (badana zawiesina);

Kolby 3 i 4 zawierające wyłącznie wodę morską (ślepa próba);

Kolba 5 zawierająca substancję odniesienia (próba kontrolna procedury);

Kolba 6 zawierająca badaną substancję i substancję odniesienia (próba kontrolna toksyczności) – nieobowiązkowa;

Kolba 7 zawierająca badaną substancję i środek sterylizujący (abiotyczna sterylna próba kontrolna) – nieobowiązkowa.

([1]) Chlorek rtęci (II) ($HgCl_2$) jest bardzo toksyczną substancją, wymagającą zachowania odpowiednich środków ostrożności. Uwodnione odpady, zawierające tę substancję chemiczną, należy usuwać we właściwy sposób; nie wolno odprowadzać ich do kanalizacji ściekowej.

▼M6

Analiza rozpuszczonego węgla organicznego

22. W trakcie badania należy pobierać próbki do analizy rozpuszczonego węgla organicznego w odpowiednich odstępach czasu (zob. dodatek 1). Próbki należy pobierać zawsze na początku badania (dzień 0) i w 60. dniu badania. Aby opisać przebieg degradacji w czasie, należy pobrać łącznie co najmniej pięć próbek. Nie można określić żadnego ustalonego harmonogramu pobierania próbek, ponieważ tempo biodegradacji jest różne. Należy dwukrotnie wykonać oznaczenie rozpuszczonego węgla organicznego dla każdej próbki.

Pobieranie próbek

23. Wymagana objętość próbek zależy od metody analitycznej (analiza szczegółowa), zastosowanego analizatora węgla i od procedury (filtracja membranowa lub odwirowanie) wybranej w celu obróbki próbek przed oznaczeniem węgla (pkt 25 i 26). Przed pobraniem próbek należy upewnić się, czy środowisko badania jest dobrze wymieszane i czy wszelkie substancje przylegające do ściany kolby zostały rozpuszczone lub znalazły się w zawiesinie.

24. Natychmiast po pobraniu próbek należy je przefiltrować na filtrze membranowym lub odwirować. W razie potrzeby należy przechowywać odfiltrowane lub odwirowane próbki w temperaturze 2–4 °C przez okres do 48 godzin lub w temp. – 18 °C przez dłuższe okresy (jeżeli wiadomo, że w substancji nie nastąpią zmiany, należy zakwasić do pH 2 przed przechowywaniem).

25. Filtry membranowe (0,2–0,45 μm) są odpowiednie, w przypadku gdy upewniono się, że nie przepuszczają węgla ani nie adsorbują substancji podczas filtracji, np. membranowe filtry poliwęglanowe. Niektóre filtry membranowe są impregnowane środkami powierzchniowo czynnymi w celu hydrofilizacji i mogą uwalniać znaczne ilości rozpuszczonego węgla. Filtry takie należy przygotować, wygotowując je trzykrotnie w wodzie dejonizowanej, za każdym razem przez godzinę. Po wygotowaniu filtry należy przechowywać w wodzie dejonizowanej. Odrzucić pierwsze 20 ml filtratu.

26. Odwirowanie próbek można wybrać jako alternatywę dla filtracji mebranowej. Odwirowywać przy 40 000 m/s^{-2} (~ 4 000 g) przez 15 minut, najlepiej w schłodzonej wirówce.

Uwaga: zróżnicowanie zawartości całkowitego węgla organicznego (TOC) względem rozpuszczonego węgla organicznego (TOC/DOC) przez odwirowanie przy bardzo niskich stężeniach wydaje się nieskuteczne, ponieważ nie zostają usunięte wszystkie bakterie albo węgiel jako składnik plazmy bakteryjnej ponownie się rozpuszcza. Wydaje się, że przy wyższych badanych stężeniach (> 10 mg C na litr) błąd związany z odwirowywaniem jest stosunkowo mały.

Częstotliwość pobierania próbek

27. Jeżeli analizy przeprowadza się natychmiast po pobraniu próbek, czas następnego pobrania próbek należy oszacować na podstawie wyniku oznaczenia analitycznego.

28. Jeżeli próbki zachowuje się (pkt 24) do późniejszej analizy, należy pobrać więcej próbek niż minimalne pięć. Najpierw poddać analizie ostatnie próbki; stopniowa selekcja „wsteczna” właściwych próbek do analizy umożliwia uzyskanie dobrego opisu krzywej biodegradacji przy stosunkowo niewielkiej liczbie oznaczeń analitycznych. Jeżeli do zakończenia badania nie nastąpi żadna degradacja, nie ma potrzeby analizowania dalszych próbek; w tej sytuacji strategia „wsteczna” może przyczynić się do zaoszczędzenia znacznych kosztów związanych z analizami.

▼M6

29. Jeżeli krzywa degradacji osiąga stan równowagi przed 60 dniem, należy zakończyć badanie. Jeżeli degradacja w oczywisty sposób rozpoczęła się przed 60. dniem, ale nie osiągnęła stanu równowagi, należy przedłużyć eksperyment na kolejny okres.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

30. Wyniki analiz należy wpisać do załączonej karty charakterystyki (dodatek 2) i obliczyć wartości biodegradacji zarówno substancji badanej, jak i substancji odniesienia za pomocą równania:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

gdzie:

D_t = degradacja w procentach rozpuszczonego węgla organicznego lub usunięcia konkretnej substancji w czasie t,

C_o = stężenie początkowe rozpuszczonego węgla organicznego lub konkretnej substancji w środowisku badania,

C_t = stężenie rozpuszczonego węgla organicznego lub konkretnej substancji w środowisku badania w czasie t,

$C_{bl(0)}$ = stężenie początkowe rozpuszczonego węgla organicznego lub konkretnej substancji w ślepej próbie,

$C_{bl(t)}$ = stężenie rozpuszczonego węgla organicznego lub konkretnej substancji w ślepej próbie w czasie t.

31. Degradację podać jako wartość procentową usunięcia rozpuszczonego węgla organicznego (degradacja ostateczna) lub usunięcie konkretnej substancji (degradacja pierwotna) w czasie t. Stężenia rozpuszczonego węgla organicznego obliczać z dokładnością do 0,1 mg na litr, a średnie wartości D_t należy zaokrąglić z dokładnością do pełnego procenta.

32. Przebieg degradacji należy zilustrować graficznie na diagramie, jak pokazano na rys. „Ważność i interpretacja wyników”. Jeżeli dostępne są wystarczające dane, z krzywej należy wyznaczyć fazę zwłoki (t_L) i czas od zakończenia fazy zwłoki potrzebny do osiągnięcia 50 % usunięcia (t_{50}).

Sprawozdanie z badania

33. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

— cechy fizyczne, oraz, w stosownych przypadkach, właściwości fizykochemiczne;

— dane dotyczące tożsamości.

Warunki badania:

— lokalizacja i opis pobrania próbki; ocena poziomu zanieczyszczenia i składników odżywczych (liczba drobnoustrojów, azotany, związki amonu, fosforany, w stosownych przypadkach);

— charakterystyka próbki (data pobrania próbki, głębokość, wygląd, temperatura, zasolenie, rozpuszczony węgiel organiczny (nieobowiązkowe), upływ czasu od pobrania do użycia w badaniu;

▼M6

— metoda (jeśli została zastosowana) do starzenia wody morskiej;

— metoda wstępnego oczyszczania (filtracja/sedymentacja) wody morskiej;

— metoda zastosowana do oznaczenia rozpuszczonego węgla organicznego;

— metoda zastosowana do szczegółowej analizy (nieobowiązkowa);

— metoda zastosowana do oznaczania liczby organizmów cudzożywnych w wodzie morskiej (liczba kolonii lub inna procedura) (nieobowiązkowa);

— inne metody (nieobowiązkowe) zastosowane w celu scharakteryzowania wody morskiej (pomiary ATP itd.).

Wyniki:

— dane analityczne zamieszczone w karcie charakterystyki (dodatek 2);

— przebieg badania degradacji przedstawia się graficznie na wykresie pokazującym fazę zwłoki (t_L), kąt nachylenia krzywej i czas (od zakończenia fazy zwłoki) potrzebny do osiągnięcia 50 % usunięcia (t_{50}). Fazę zwłoki można oszacować graficznie, jak pokazano na rysunku w sekcji „Ważność i interpretacja wyników”, lub dogodnie przyjąć jako czas potrzebny do osiągnięcia degradacji na poziomie 10 %;

— procentowa degradacja zmierzona po 60 dniach albo na koniec badania.

Omówienie wyników.

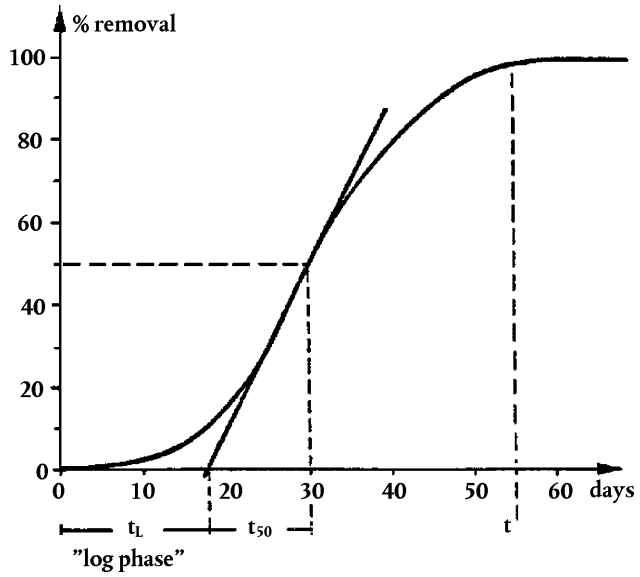
Ważność i interpretacja wyników

34. Wyniki otrzymane z zastosowaniem substancji odniesienia, np. benzoesanu sodu, octanu sodu i aniliny, powinny być porównywalne z wynikami otrzymanymi w badaniu międzylaboratoryjnym (3) (należy odnieść się do sekcji „Substancje odniesienia”, pkt 7). Jeżeli wyniki otrzymane z zastosowaniem substancji odniesienia są nietypowe, badanie należy powtórzyć, wykorzystując inną próbkę wody morskiej. Choć wyniki badań zahamowania nie zawsze mogą być proste w interpretacji, ponieważ badana substancja stanowi dodatkowe źródło rozpuszczonego węgla organicznego, znaczący spadek tempa usuwania całkowitego rozpuszczonego węgla organicznego, w porównaniu z próbą kontrolną, stanowi dodatnią oznakę skutków toksycznych.

35. W związku z tym, że zastosowane badane stężenia są stosunkowo wysokie w porównaniu z większością naturalnych systemów (i w konsekwencji z niekorzystnym stosunkiem między stężeniem badanych substancji i innych źródeł węgla), metodę tę należy uważać za badanie wstępne, które można wykorzystać do wskazania, czy dana substancja łatwo ulega biodegradacji. Zatem niski wynik niekoniecznie oznacza, że badana substancja nie ulega biodegradacji w środowiskach morskich, lecz wskazuje, że potrzebny będzie większy wkład pracy, aby to ustalić.

Na poniższym rysunku pokazano przykład teoretycznego badania degradacji ilustrujący wykonalny sposób oszacowania wartości t_L (długość „fazy zwłoki”) i t_{50} (przedział czasowy, zaczynający się w momencie t_L, potrzebny do osiągnięcia usunięcia na poziomie 50 %).

▼M6



METODA „ZAMKNIĘTEJ BUTLI"

WPROWADZENIE

1. Metoda ta stanowi wariant badania „zamkniętej butli" (5) i została ostatecznie opracowana w wyniku badania międzylaboratoryjnego zorganizowanego dla Komisji Europejskiej przez Danish Water Quality Institute (3).

2. Podobnie jak w przypadku towarzyszącej metody wytrząsania w kolbie z wodą morską, wyniki tego badania nie mają zostać przyjęte jako wskaźniki szybkiej biodegradowalności, ale mają być konkretnie wykorzystywane do uzyskania informacji na temat biodegradowalności substancji w środowiskach morskich.

ZASADA METODY

3. Uprzednio określoną ilość badanej substancji rozpuszcza się w środowisku badania w stężeniu wynoszącym zwykle 2–10 mg badanej substancji na litr (można zastosować jedno stężenie lub więcej). Roztwór przechowuje się w napełnionej zamkniętej butli bez dostępu światła w łaźni stałotemperaturowej lub w obudowie o temperaturze kontrolowanej z dokładnością do ± 1 °C w zakresie 15–20 °C. W przypadkach, w których celem badania jest symulowanie sytuacji środowiskowych, można prowadzić badania poza normalnym zakresem temperatury, pod warunkiem że odpowiednio skoryguje się kontrolę temperatury. Po degradacji następuje 28 dniowy okres analiz tlenu.

4. Badanie międzylaboratoryjne wykazało, że w przypadku gdy badanie przedłużano powyżej 28 dni, nie można było uzyskać żadnych użytecznych informacji, w większości przypadków ze względu na poważne zakłócenia. Wartości biochemicznego zapotrzebowania na tlen (BZT) w ślepej próbie były nadmiernie wysokie, prawdopodobnie ze względu na porosty występujące na ściankach na skutek braku potrząsania, a także w wyniku nitryfikacji. W związku z tym zalecany czas wynosi 28 dni, jeżeli jednak wartość BZT w ślepej próbie pozostaje w granicach 30 % (pkt 15 i 40), badanie można przedłużyć.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI

5. Aby stwierdzić, czy badanie może zostać zastosowane w odniesieniu do konkretnej substancji, muszą być znane jej niektóre właściwości. Aby obliczyć teoretyczne zapotrzebowanie na tlen (TZT), wymagany jest wzór empiryczny (zob. dodatek 3); w przeciwnym razie należy oznaczyć chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT) danej substancji, aby służyło jako wartość odniesienia. Wykorzystanie ChZT jest mniej zadowalające, ponieważ niektóre substancje nie utleniają się całkowicie w badaniu ChZT.

▼M6

6. Rozpuszczalność substancji powinna wynosić co najmniej 2 mg/l, choć w zasadzie można badać substancje, które są rozpuszczalne w mniejszym stopniu, takie jak substancje lotne (np. stosując działanie ultradźwiękami). Wymagane są informacje na temat czystości lub względnych proporcji głównych składników badanej substancji, aby można było zinterpretować uzyskane wyniki, zwłaszcza gdy wynik jest zbliżony do poziomu akceptacji.

7. Informacje na temat toksyczności badanej substancji w stosunku do bakterii, np. mierzone w krótkich badaniach oddychania (4), mogą być bardzo użyteczne przy wyborze odpowiednich badanych stężeń i mogą mieć istotne znaczenie dla prawidłowej interpretacji niskich wartości biodegradacji. Informacje takie nie zawsze jednak wystarczą, aby dokonać interpretacji wyników uzyskanych w badaniu biodegradacji, więc procedura opisana w pkt 27 jest bardziej odpowiednia.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

8. W celu sprawdzenia aktywności mikroorganizmów w próbce wody morskiej należy zastosować właściwe substancje odniesienia. Anilina, octan sodu i benzoesan sodu to przykłady substancji, które można zastosować w tym celu. Degradacja tych substancji na poziomie co najmniej 60 % (ich TZT) musi zajść w odpowiednio krótkim czasie, w przeciwnym razie zaleca się powtórzenie badania z wykorzystaniem innej próbki wody morskiej.

9. W badaniu międzylaboratoryjnym KE, w którym próbki wody morskiej pobierano w różnych lokalizacjach i o różnych porach roku, faza zwłoki (t_L) i czas potrzebny do osiągnięcia degradacji na poziomie 50 % (t_{50}), z wyłączeniem fazy zwłoki, w przypadku benzoesanu sodu wynosiły odpowiednio 0–2 dni i 1–4 dni. W przypadku aniliny wartości t_L i t_{50} wynosiły odpowiednio 0–7 i 2–12 dni.

ODTWARZALNOŚĆ

10. Odtwarzalność tych metod ustalono w badaniu międzylaboratoryjnym KE (3).

OPIS METODY

Aparatura

11. Zwykły sprzęt laboratoryjny oraz:

a) można wykorzystać butle do BZT o pojemności 250–300 ml ze szklanymi korkami lub butlę z cienką szyjką o pojemności 250 ml ze szklanym korkiem;

b) Kilka butli o pojemności 2, 3 i 4 litrów do przygotowania eksperymentu i napełniania butli do BZT;

c) łaźnia wodna lub stała temperatura pokojowa w celu utrzymania stałej temperatury butli (± 1 °C) z wyłączeniem światła;

d) wyposażenie do analizy rozpuszczonego tlenu;

e) Filtry membranowe, 0,2–0,45 μm (nieobowiązkowe);

f) urządzenia do szczegółowej analizy (nieobowiązkowe).

Woda morska

12. Należy pobrać próbkę wody morskiej do dokładnie oczyszczonego pojemnika i przetransportować do laboratorium, najlepiej w ciągu jednego lub dwóch dni od pobrania. Podczas transportu temperatura próbki nie powinna znacząco przekraczać temperatury stosowanej w badaniu.

▼M6

13. Należy dokładnie zidentyfikować miejsce pobrania próbki i opisać je pod względem poziomu zanieczyszczenia i składników odżywczych. W szczególności w przypadku wód przybrzeżnych lub zanieczyszczonych należy uwzględnić w tej charakterystyce liczbę kolonii drobnoustrojów cudzożywnych i określenie stężeń rozpuszczonych azotanów, związków amonu i fosforanów.

14. W odniesieniu do samej próbki wody morskiej należy podać następujące informacje:

— data pobrania;

— głębokość pobrania;

— wygląd próbki – mętna itd.;

— temperatura w czasie pobrania;

— zasolenie;

— rozpuszczony węgiel organiczny (DOC);

— upływ czasu między pobraniem i wykorzystaniem w badaniu.

15. Jeżeli zawartość rozpuszczonego węgla organicznego w próbce okaże się duża lub jeżeli uzna się, że BZT ślepej próby po 28 dniach wynosiłoby więcej niż 30 % BZT substancji odniesienia, zaleca się starzenie wody morskiej co najmniej przez tydzień.

16. Podczas starzenia wodę przechowywać w warunkach tlenowych w temperaturze badania i bez dostępu światła lub w rozproszonym świetle. W razie potrzeby należy utrzymać warunki tlenowe zapewniając delikatne napowietrzanie. Podczas starzenia wody zmniejsza się zawartość łatwo rozkładających się substancji organicznych. W badaniu międzylaboratoryjnym (3) nie wykazano żadnej różnicy między potencjałem degradacji postarzonych próbek wody morskiej i świeżo pobranych próbek.

17. Przed użyciem należy wstępnie oczyścić wodę morską, usuwając duże cząstki, np. filtrując przez filtr nylonowy lub przez zgrubny filtr papierowy (nie przez filtry membranowe lub filtry GF/C) bądź stosując sedymentację i dekantację. Zastosowaną procedurę należy podać w sprawozdaniu. Wstępne oczyszczanie należy przeprowadzić po starzeniu wody, jeżeli ta procedura została zastosowana.

Roztwory podstawowe dla mineralnych składników odżywczych

18. Przygotować następujące roztwory podstawowe, stosując odczynniki do analiz.

a)	Diwodoroortofosforan potasu, KH_2PO_4	8,50 g
	Monowodoroortofosforan dipotasu, K_2HPO_4	21,75 g
	Dwuwodny wodoroortofosforan disodu, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Chlorek amonu, NH_4Cl	0,50 g
	Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.	
b)	Chlorek wapnia, $CaCl_2$	27,50 g
	Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.	
c)	Siedmiowodny siarczan magnezu, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.	
d)	Sześciowodny chlorek żelaza(III), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.	

▼M6

Można uniknąć strącania w roztworze d), dodając jedną kroplę stężonego HCl albo 0,4 g kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA, sól dwusodowa) na litr. Jeżeli w roztworze podstawowym powstanie zawiesina, należy zastąpić go świeżo przygotowanym roztworem.

Przygotowanie środowiska badania

19. Należy dodać 1 ml każdego z powyższych roztworów podstawowych na każdy litr wstępnie oczyszczonej wody morskiej. Należy nasycić środowisko badania powietrzem o temperaturze badania, napowietrzając je w tym celu czystym sprężonym powietrzem przez około 20 minut. Należy oznaczyć stężenie rozpuszczonego tlenu do celów kontrolnych. Nasycone stężenie rozpuszczonego tlenu, będące funkcją zasolenia i temperatury, można odczytać z nomogramu dołączonego do niniejszej metody badawczej (dodatek 4).

Inokulum

20. Nie dodawać konkretnego inokulum w celu uzupełnienia mikroorganizmów już obecnych w wodzie morskiej. Należy określić (nieobowiązkowo) liczbę organizmów cudzożywnych tworzących kolonie w środowisku badania z wody morskiej (a najlepiej również w początkowej próbce wody morskiej), np. przez liczba kolonii na agarze morskim. Jest to szczególnie pożądane w przypadku próbek z terenów przybrzeżnych lub zanieczyszczonych. Sprawdzić aktywność mikroorganizmów cudzożywnych w wodzie morskiej, przeprowadzając badanie z substancją odniesienia.

Przygotowanie butelek badawczych

21. Przeprowadzić wszystkie niezbędne operacje, w tym starzenie i wstępne oczyszczanie wody morskiej w wybranej temperaturze badania wynoszącej 15–20 °C, zapewniając czystość, ale nie sterylność wszystkich naczyń szklanych.

22. Przygotować grupy butli do BZT w celu oznaczenia biochemicznego zapotrzebowania na tlen substancji badanej i substancji odniesienia w równoległych seriach doświadczalnych. Wszystkie analizy należy wykonywać w duplikacie (ślepe próby, substancja odniesienia i substancja badana), tj. dla każdego oznaczenia należy przygotować po dwie butle. Wykonać analizy co najmniej w dniach 0, 5, 15 i 28 (cztery oznaczenia). W przypadku analiz tlenu dla potrzeb czterech oznaczeń wymagana jest całkowita liczb butli $3 \times 2 \times 4 = 24$ (ślepe próby, substancja odniesienia i substancja badana), czyli około 8 litrów środowiska badania (dla jednego stężenia badanej substancji).

23. Przygotować oddzielne roztwory substancji badanej i substancji odniesienia w dużych butlach o wystarczającej objętości (pkt 11), najpierw dodając substancję badaną i substancję odniesienia, bezpośrednio lub z wykorzystaniem stężonego roztworu podstawowego, do częściowo napełnionych dużych butli. Dodać większą ilość środowiska badania w celu uzyskania ostatecznego żądanego stężenia. Jeżeli stosuje się roztwory podstawowe badanej substancji lub substancji odniesienia, upewnić się, czy zasolenie środowisko wody morskiej nie uległo znacznej zmianie.

24. Wybrać stężenia badanej substancji i substancji odniesienia, uwzględniając:

a) rozpuszczalność tlenu w wodzie morskiej w warunkach występujących w badaniu temperatury i zasolenia (zob. nomogram w dodatku 4);

b) ślepą próbę BZT wody morskiej; oraz

c) oczekiwaną biodegradowalność badanej substancji.

▼M6

25. W temperaturze 15 °C i 20 °C oraz przy zasoleniu (woda oceaniczna) wynoszącym 32 cząstki na 1 000 rozpuszczalność tlenu wynosi odpowiednio około 8,1 i 7,4 mg/l. Jeżeli woda morska nie jest postarzona, zapotrzebowanie na tlen w samej wodzie morskiej (oddychanie w ślepej próbie) może wynosić 2 mg O_2/l lub więcej. W związku z tym, aby zapewnić znaczące stężenie tlenu po utlenieniu badanej substancji, należy wykorzystać stężenie początkowe badanej substancji, wynoszące około 2–3 mg/l (w zależności od TZT) w przypadku substancji, które mają ulec całkowitej degradacji w warunkach badania (takich jak substancje odniesienia). Słabo rozpuszczalne substancje należy badać w wyższych stężeniach, do około 10 mg/l, pod warunkiem że nie występują skutki toksyczne. Korzystne może być przeprowadzenie badań równoległych z niskim (około 2 mg/l) i wysokim (około 10 mg/l) stężeniem badanej substancji.

26. Należy równolegle oznaczyć ślepą próbę tlenową w butlach niezawierających ani substancji badanej, ani substancji odniesienia.

27. W celu oznaczenia działania hamującego należy przygotować następujące serie roztworów w oddzielnych dużych butlach (pkt 13):

a) 2 mg na litr substancji ulegającej łatwo degradacji, np. którejkolwiek ze wspomnianych substancji odniesienia;

b) x mg na litr badanej substancji (x zwykle wynosi 2);

c) 2 mg na litr łatwo rozkładającej się substancji plus x mg na litr badanej substancji.

Fizykochemiczna próba kontrolna (nieobowiązkowa)

28. Jeżeli wykorzystuje się opcję szczegółowych analiz, można przeprowadzić badanie fizykochemiczne w celu sprawdzenia, czy badana substancja jest usuwana w wyniku mechanizmów abiotycznych, takich jak hydroliza i adsorpcja. Fizykochemiczną próbę kontrolną można wykonać dodając chlorek rtęci(II) ($HgCl_2$) ([1]) (50–100 mg/l) do kolb w duplikacie zawierających badaną substancję w celu zatrzymania aktywności mikrobiologicznej. Znaczące obniżenie specyficznego stężenia substancji w trakcie badania wskazuje na występowanie abiotycznych mechanizmów usuwania.

Liczba butli do badania BZT w typowej analizie

29. W typowej analizie stosuje się następujące butle:

— co najmniej 8 butli zawierających badaną substancję;

— co najmniej 8 butli zawierających samą wodę morską wzbogaconą o składniki odżywcze;

— co najmniej 8 butli zawierających substancję odniesienia oraz, w razie potrzeby,

— 6 butli zawierających substancję badaną i substancję odniesienia (próby kontrolne toksyczności).

PROCEDURA

30. Po przygotowaniu natychmiast zasyfonować każdy roztwór z dolnej ćwiartki (nie z dna) właściwej dużej butli w celu napełnienia odpowiedniej grupy butli do badania BZT. Należy natychmiast przeprowadzić analizę zerowych prób kontrolnych (czas zero) pod kątem zawartości rozpuszczonego tlenu (pkt 33) lub zachować je w celu dalszej analizy chemicznej przez strącenie za pomocą $MnCl_2$ (chlorek manganu(II)) i NaOH (wodorotlenek sodu).

([1]) Chlorek rtęci(II) ($HgCl_2$) jest bardzo toksyczną substancją, wymagającą zachowania odpowiednich środków ostrożności. Uwodnione odpady, zawierające tę substancję chemiczną, należy usuwać we właściwy sposób; nie wolno odprowadzać ich bezpośrednio do kanalizacji ściekowej.

▼M6

31. Pozostałe równoległe butle do badania BZT należy inkubować w temperaturze badania (15–20 °C), przechowywać bez dostępu światła i usuwać z miejsca inkubacji w odpowiednich odstępach czasu (np. co najmniej po 5, 15 i 28 dniach), wykonując analizę na zawartość rozpuszczonego tlenu (pkt 33).

32. W celu przeprowadzenia szczegółowych analiz (nieobowiązkowe) należy poddać próbki filtracji na filtrze membranowym (0,2–0,45 μm) lub odwirowywać je przez 15 minut. Przechowywać próbki przez okres nie dłuższy niż 48 godzin w temperaturze 2–4 °C lub przez dłuższe okresy w temperaturze – 18 °C, jeżeli analiza nie jest wykonywana natychmiast (jeżeli wiadomo, że w badanej substancji nie nastąpią zmiany, należy zakwasić ją do pH 2 przed przechowywaniem).

Oznaczenie rozpuszczonego tlenu

33. Stężenie rozpuszczonego tlenu należy oznaczyć metodą chemiczną lub elektrochemiczną, uznaną na poziomie krajowym lub międzynarodowym.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

34. Wyniki analiz należy wpisać do załączonej karty charakterystyki (dodatek 5).

35. Obliczyć biochemiczne zapotrzebowanie na tlen jako różnicę w ubytku tlenu między ślepą próbą i roztworem badanej substancji w warunkach badania. Podzielić ubytek tlenu netto przez stężenie (w/v) substancji w celu wyrażenia biochemicznego zapotrzebowania na tlen jako mg BZT na mg badanej substancji. Degradację określa się jako stosunek biochemicznego zapotrzebowania na tlen najlepiej do teoretycznego zapotrzebowania na tlen (TZT) albo do chemicznego zapotrzebowaniem na tlen (ChZT) i wyraża jako procent (zob. pkt 36).

36. Obliczyć wartości biodegradacji dla każdego czasu pobrania próbek zarówno dla substancji badanej, jak i dla substancji odniesienia za pomocą jednego z równań:

$$\%\ biodegradacji = \frac{mg\ O_2/mg badanej\ substancji}{mg\ TZT/mg badanej\ substancji} \times 100$$

$$\%\ biodegradacji = \frac{mg\ O_2/mg badanej\ substancji}{mg\ ChZT/mg badanej\ substancji} \times 100$$

gdzie:

TZT = teoretyczne zapotrzebowanie na tlen (obliczenia w dodatku 3)

ChZT = chemiczne zapotrzebowanie na tlen oznaczone doświadczalnie.

Uwaga: niekiedy te dwa sposoby obliczania (procent TZT lub procent ChZT) nie dają takich samych wyników; lepiej jest stosować TZT, ponieważ w badaniu ChZT niektóre substancje nie utleniają się całkowicie.

37. Przebieg degradacji należy zilustrować graficznie na diagramie (zob. przykład w sekcji „Ważność i interpretacja wyników”). Jeżeli dostępne są wystarczające dane, z krzywej biodegradacji należy wyznaczyć fazę zwłoki (t_L) i czas od zakończenia fazy zwłoki (t_{50}) potrzebny do osiągnięcia 50 % usunięcia.

38. Jeżeli stosuje się szczegółową analizę (nieobowiązkową), należy podać procent pierwotnej degradacji jako procent usuwania konkretnej substancji w czasie trwania badania (skorygowany dla celów analitycznej próby ślepej).

▼M6

Sprawozdanie z badania

39. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

— cechy fizyczne, oraz, w stosownych przypadkach, właściwości fizykochemiczne;

— dane dotyczące tożsamości.

Warunki badania:

— lokalizacja i opis pobrania próbki; ocena poziomu zanieczyszczenia i składników odżywczych (liczba kolonii, azotany, związki amonu, fosforany, w stosownych przypadkach);

— charakterystyka próbki (data pobrania próbki, głębokość, wygląd, temperatura, zasolenie, rozpuszczony węgiel organiczny (nieobowiązkowe), upływ czasu od pobrania do użycia w badaniu);

— metoda (jeśli została zastosowana) do starzenia wody morskiej;

— metoda wstępnego oczyszczania (filtracja/sedymentacja) wody morskiej;

— metoda oznaczania ChZT (jeżeli zostało wykonane);

— metoda pomiarów tlenu;

— procedura dyspersji w przypadku substancji, które są trudno rozpuszczalne w warunkach badania;

— metoda zastosowana do oznaczania liczby organizmów cudzożywnych w wodzie morskiej (liczba drobnoustrojów lub inna procedura);

— metoda zastosowana do oznaczania rozpuszczonego węgla organicznego w wodzie morskiej (nieobowiązkowe);

— metoda zastosowana do szczegółowej analizy (nieobowiązkowa);

— inne nieobowiązkowe metody zastosowane w celu scharakteryzowania wody morskiej (pomiary ATP itd.).

Wyniki:

— dane analityczne zamieszczone w karcie charakterystyki (załączonej w dodatku 5);

— przebieg badania degradacji przedstawiony graficznie na diagramie pokazującym fazę zwłoki (t_L), kąt nachylenia krzywej i czas (od zakończenia fazy zwłoki) potrzebny do osiągnięcia 50 % ostatecznej absorpcji tlenu spowodowanej utlenianiem badanej substancji (t_{50}). Fazę zwłoki można oszacować graficznie, jak pokazano na załączonym rysunku, lub odpowiednio przyjąć jako czas potrzebny do osiągnięcia degradacji na poziomie 10 %;

— procent degradacji zmierzony po 28 dniach.

Omówienie wyników.

Ważność i interpretacja wyników

40. Samo oddychanie w ślepej próbie nie powinno przekroczyć zużycia 30 % tlenu w butelce badawczej. Jeżeli nie można spełnić tego kryterium przy użyciu świeżo pobranej wody morskiej, wodę morską należy przed wykorzystaniem poddać procesowi starzenia (ustabilizować).

41. Należy uwzględnić możliwość, że substancje zawierające azot mogą wpłynąć na wyniki.

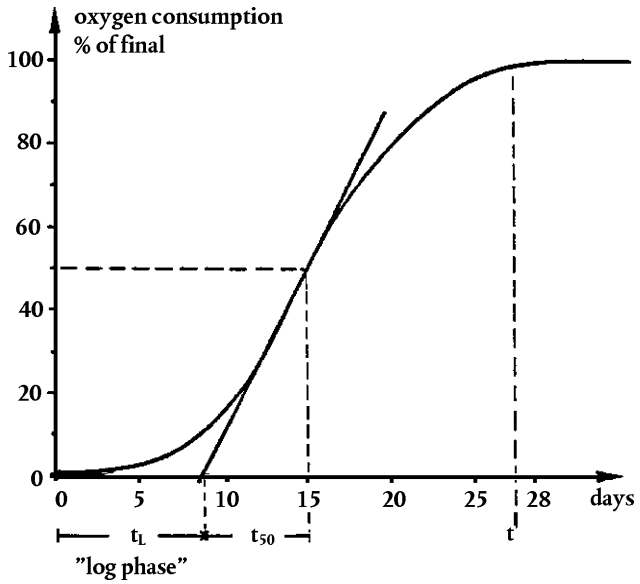
▼M6

42. Wyniki otrzymane w przypadku substancji odniesienia, tj. benzoesanu sodu i aniliny, powinny być porównywalne z wynikami otrzymanymi w badaniu międzylaboratoryjnym (3) (pkt 9). Jeżeli wyniki otrzymane z zastosowaniem substancji odniesienia są nietypowe, badanie należy powtórzyć, wykorzystując inną próbkę wody morskiej.

43. Badaną substancję można uznać za hamującą rozwój bakterii (przy zastosowanym stężeniu), jeżeli biochemiczne zapotrzebowanie na tlen w mieszaninie substancji odniesienia i substancji badanej wynosi mniej niż suma biochemicznego zapotrzebowania na tlen w oddzielnych roztworach tych dwóch substancji.

44. W związku z tym, że badane stężenia są stosunkowo wysokie w porównaniu do większości naturalnych systemów, a w konsekwencji stosunek stężenia badanych substancji do innych źródeł węgla jest niekorzystny, metodę tę należy uważać za badanie wstępne, które można wykorzystać jako wskazanie, czy dana substancja łatwo ulega biodegradacji. Zatem niski wynik niekoniecznie oznacza, że badana substancja nie ulega biodegradacji w środowiskach morskich, lecz wskazuje, że potrzeba będzie więcej pracy, aby to ustalić.

Poniżej podano przykład teoretycznego eksperymentu z degradacją, ilustrujący wykonalny sposób oszacowania wartości t_L (długość „fazy zwłoki") i przedziału czasowego t_{50} (rozpoczynającego się w momencie t_L) potrzebny do osiągnięcia 50 %, ostatecznej absorpcji tlenu spowodowanej utlenianiem badanej substancji:



BIBLIOGRAFIA

(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) Rozdział C.4-B niniejszego załącznika: Oznaczenie szybkiej biodegradowalności, część III zmodyfikowanego badania przesiewowego OECD.

(3) Nyholm N. i Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Sprawozdanie końcowe z programu badań międzylaboratoryjnych 1984-1985, marzec 1987, Komisja Wspólnot Europejskich.

(4) Rozdział C.11 niniejszego załącznika: Biodegradacja – osad czynny, badanie hamowania oddychania.

(5) Rozdział C.4-E niniejszego załącznika: Oznaczenie szybkiej biodegradowalności, część VI. Badanie metodą zamkniętej butli.

▼M6

Dodatek 1

Oznaczanie węgla organicznego w wodzie morskiej

METODA WYTRZĄSANIA W KOLBIE

W celu oznaczenia węgla organicznego w próbce wody związki organiczne w próbce utlenia się do dwutlenku węgla, stosując zwykle jedną z następujących trzech technik:

— utlenianie na mokro nadsiarczanem/promieniowaniem UV;

— utlenianie na mokro nadsiarczanem/w podwyższonej temperaturze (116–130 °C);

— spalanie.

Powstały CO_2 oznacza się, stosując spektrofotometrię w podczerwieni lub miareczkowanie. Ewentualnie redukuje się CO_2 do metanu, który oznacza się w detektorze płomienno-jonizacyjnym.

Metodę oznaczania nadsiarczanem/promieniowaniem UV stosuje się powszechnie do analizy „czystej" wody z małą zawartością cząstek stałych. Te dwie ostatnie metody można stosować w przypadku większości rodzajów próbek wody, przy czym metoda utleniania nadsiarczanem/w podwyższonej temperaturze jest najodpowiedniejsza w odniesieniu do próbek niskopoziomowych, a technikę spalania stosuje się do próbek o zawartości nielotnego węgla organicznego przewyższającej znacznie 1 mg C/l.

Zakłócenia

Wszystkie trzy metody są zależne od wydzielania lub kompensowania węgla nieorganicznego obecnego w próbce. Oczyszczanie zakwaszonej próbki z CO_2 to najczęściej stosowana metoda eliminowania węgla nieorganicznego, choć prowadzi to również do straty lotnych związków organicznych (1). Należy zapewnić całkowite wyeliminowanie lub skompensowanie węgla nieorganicznego dla matrycy każdej próbki, a lotny węgiel organiczny należy oznaczyć wraz z nielotnym węglem organicznym, w zależności od rodzaju próbki.

Wysokie stężenia chloru prowadzą do obniżenia efektywności utleniania w przypadku stosowania metody z nadsiarczanem/promieniowaniem UV (2). Zastosowanie odczynnika utleniającego zmodyfikowanego dodatkiem azotanu rtęci(II) może jednak wyeliminować to zakłócenie. Zaleca się zastosowanie maksymalnej tolerowanej objętości próbki w celu dokonania oceny każdego rodzaju próbki zawierającej chlor. Wysokie stężenia soli w próbce poddanej analizie metodą spalania mogą spowodować pokrywanie katalizatora solą i nadmierne działanie żrące w rurze do spalań. Należy podjąć środki ostrożności zgodnie z instrukcją obsługi producenta.

Próbki o dużej mętności, jak również próbki zawierające cząstki stałe, można utlenić w sposób niepełny, stosując metodę z nadsiarczanem/promieniowaniem UV.

Przykład odpowiedniej metody

Nielotny węgiel organiczny oznacza się przez utlenianie nadsiarczanem/ promieniowaniem UV, a następnie ilościowe oznaczenie wydzielonego CO_2 za pomocą bezdyspersyjnej spektrometrii w podczerwieni.

Odczynnik utleniający modyfikuje się zgodnie z sugestiami podanymi w (2), jak opisano w instrukcji obsługi producenta:

a) 8,2 g $HgCl_2$ i 9,6 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ rozpuszcza się w kilkuset mililitrach wody odczynnikowej o niskim stężeniu węgla;

b) 20 g $K_2S_2O_8$ rozpuszcza się w roztworze z solą rtęci;

▼**M6**

c) do mieszaniny dodaje się 5 ml HNO_3 (stężonego);

d) odczynnik rozcieńcza się do 1 000 ml;

Zakłócenie spowodowane przez chlor eliminuje się, stosując objętość próbki 40 µl w przypadku 10 % chlorku i objętość próbki 200 µl w przypadku 1,9 % chlorku. Próbki o wysokich stężeniach chlorku lub większej objętości można analizować tą metodą, pod warunkiem że zapobiega się akumulacji chlorku w naczyniu do utleniania. Następnie można dokonać w razie potrzeby oznaczenia lotnego węgla organicznego w odniesieniu do danego typu próbki.

BIBLIOGRAFIA

(1) ISO, Water quality – determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, 16 stycznia 1986 r.

(2) Amerykańskie Stowarzyszenia Zdrowia Publicznego (APHA), Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. Amerykańskie Stowarzyszenie Przedsiębiorstw Wodnych (AWWA) oraz Federacja Kontroli Zanieczyszczeń Wód, wydanie 16., 1985.

Również istotne (przedstawia opis systemu autoanalizy):

(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**

Dodatek 2

Biodegradacja w wodzie morskiej

METODA WYTRZĄSANIA W KOLBIE

KARTA CHARAKTERYSTYKI

1. **LABORATORIUM:**

2. **DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA:**

3. **BADANA SUBSTANCJA:**

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: mg/l jako substancja

Początkowe stężenie, w pożywce t_0: mg/l jako substancja

mg rozpuszczonego węgla organicznego/l

4. **WODA MORSKA:**

Źródło:

Data pobrania:

Głębokość pobrania:

Wygląd w momencie pobrania (np. mętna itd.):

Zasolenie w momencie pobrania: ‰

Temperatura w momencie pobrania: °C

rozpuszczony węgiel organiczny po „x” godzinach od pobrania: mg/l

Wstępna obróbka przed badaniem (np. filtrowanie, sedymentacja, starzenie itp.):

Liczba kolonii — próbka oryginalna: kolonie/ml

— na początku badania: kolonie/ml

Inne cechy charakterystyczne:

5. **OZNACZENIA WĘGLA:**

Analizator węgla:

	Kolba nr		rozpuszczony węgiel organiczny po n dniach (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	x
Badanie: woda morska wzmocniona składnikami odżywczymi z badaną substancją	1	a_1					
		a_2					
		średnia, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		średnia, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Kolba nr		rozpuszczony węgiel organiczny po n dniach (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	x
Ślepa próba: woda morska wzmocniona składnikami odżywczymi bez badanej substancji	1	c_1					
		c_2					
		średnia, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		średnia, $C_{d(t)}$					
	średnia, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **OCENA DANYCH PIERWOTNYCH:**

Nr kolby	Obliczanie wyników	% degradacji po n dniach				
		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				
średnia arytmetyczna (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Nie należy uśredniać D_1 i D_2, jeżeli istnieje między nimi znacząca różnica.

Uwaga: podobne wzory można zastosować, gdy po degradacji wykonywana jest szczegółowa analiza oraz w przypadku substancji odniesienia i prób kontrolnych toksyczności.

7. **DEGRADACJA ABIOTYCZNA (nieobowiązkowa)**

	Czas (dni)	
	0	t
stężenie rozpuszczonego węgla organicznego (mg/l) w sterylnych próbach kontrolnych	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ degradacji abiotycznej} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

Dodatek 3

Obliczanie teoretycznego biochemicznego zapotrzebowania na tlen

METODA „ZAMKNIĘTEJ BUTLI”

TZT substancji $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ o masie cząsteczkowej MW oblicza się zgodnie z:

$$TZT_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Obliczenie to sugeruje, że C ulega mineralizacji do CO_2, H do H_2O, P do P_2O_5 a Na do Na_2O Halogen zostaje usunięty jako halogenowodór, a azot jako amoniak.

Przykład:

Glukoza $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$TZT = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 mg\ O_2/mg glukozy$$

Masy cząsteczkowe soli innych niż sole metali alkalicznych oblicza się przy założeniu, że sole uległy hydrolizie.

Zakłada się, że siarka utlenia się do siarki sześciowartościowej.

Przykład:

n-dodecylobenzenosulfonian sodu $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$TZT = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 mg\ O_2/mg substancji$$

W przypadku substancji zawierających azot można go usunąć jako amoniak, azotyn lub azotan, odpowiadający różnym biochemicznym zapotrzebowaniom na tlen.

$$TZT_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$TZT_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

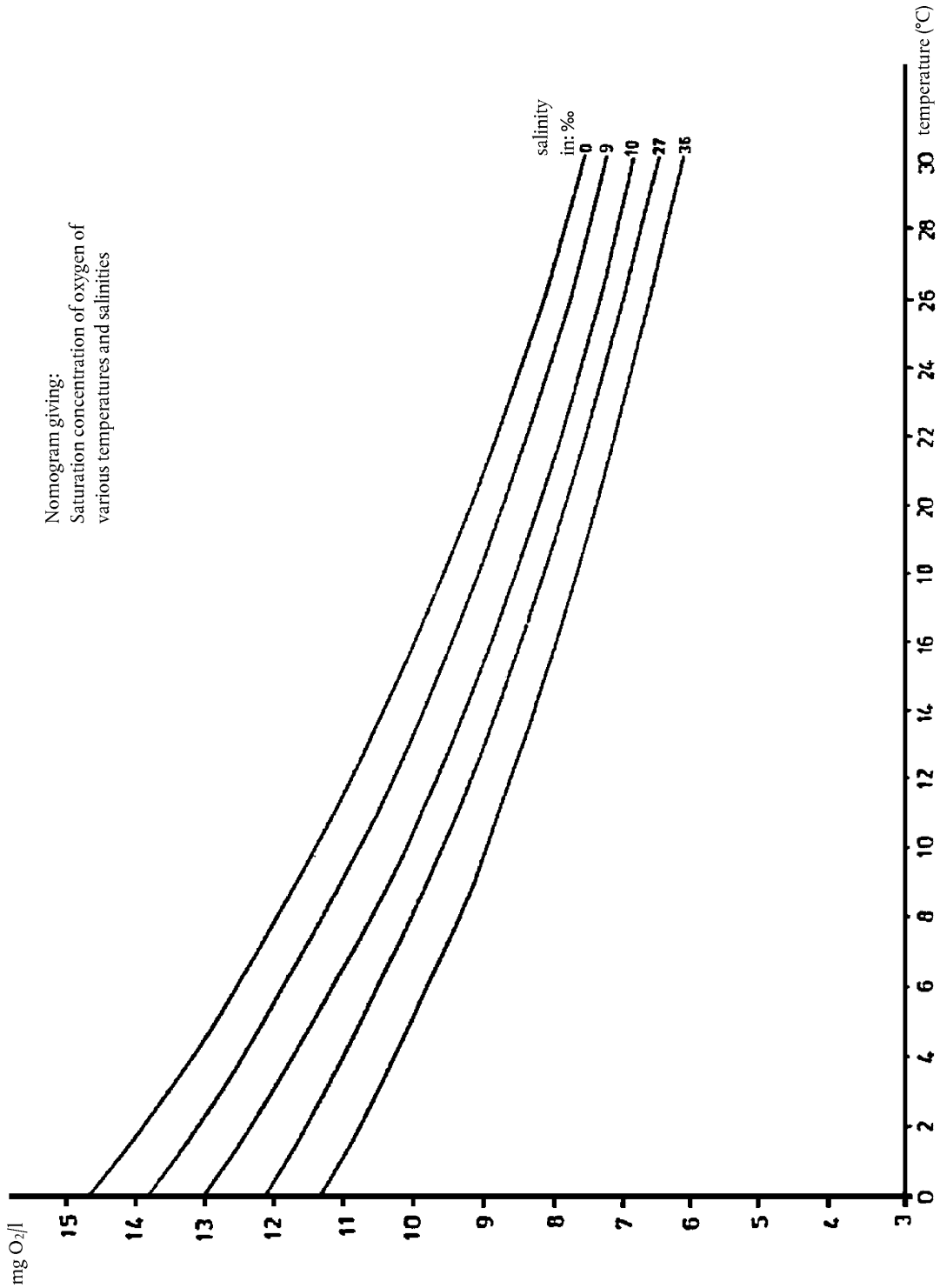
Załóżmy, że w przypadku amin drugorzędowych analiza wykazała pełne tworzenie się azotanów:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$TZT_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 mg\ O_2/mg substancji$$

▼**M6**

Dodatek 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

Dodatek 5

Biodegradacja w wodzie morskiej

METODA „ZAMKNIĘTEJ BUTLI”

KARTA CHARAKTERYSTYKI

1. **LABORATORIUM:**

2. **DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA:**

3. **BADANA SUBSTANCJA:**

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego:	mg/l
Stężenie początkowe w środowisku wody morskiej:	mg/l
TZT lub ChZT	mg O_2/mg substancji badanej

4. **WODA MORSKA:**

Źródło:

Data pobrania:

Głębokość pobrania:

Wygląd w momencie pobrania (np. mętna itd.):

Zasolenie w momencie pobrania:	‰
Temperatura w momencie pobrania:	°C
rozpuszczony węgiel organiczny po „x” godzinach od pobrania:	mg/l

Wstępna obróbka przed badaniem (np. filtrowanie, sedymentacja, starzenie itp.):

Liczba kolonii	— próbka oryginalna:	kolonie/ml
	— na początku badania:	kolonie/ml

Inne cechy charakterystyczne:

5. **ŚRODOWISKO BADANIA:**

Temperatura po napowietrzeniu:	°C
Stężenie O_2 po napowietrzeniu i sytuacja przed rozpoczęciem badania:	mg O_2/l

6. **OZNACZENIE STĘŻENIA ROZPUSZCZONEGO TLENU:**

Metoda: Winkler/elektrodowa

	Kolba nr		mg O_2/l po n dniach			
			0	5	15	28
Badanie: woda morska wzmocniona składnikami odżywczymi z badaną substancją	1	a_1				
	2	a_2				
	Średnia arytmetyczna badania	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Kolba nr		mg O_2/l po n dniach			
			0	5	15	28
Ślepa próba: składnik odżywczy – zanieczyszczona woda morska, bez badanej substancji	1	c_1				
	2	c_2				
	średnia arytmetyczna ślepej próby	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Uwaga: podobny wzór może być stosowany dla substancji odniesienia i prób kontrolnych toksyczności.

7. **ZANIKANIE STĘŻENIA ROZPUSZCZONEGO TLENU: % DEGRADACJI:**

	Zanikanie stężenia rozpuszczonego tlenu po n dniach		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ (1)			
$\% D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{badana\ substancja(mg/l) \times TZT} \times 100$			

(1) Zakłada się, że $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, przy czym
$m_{b(o)}$ = wartość ślepej próby w dniu 0,
$m_{t(o)}$ = wartość badanej substancji w dniu 0.
Jeżeli $m_{b(o)}$ nie jest równe $m_{t(o)}$, zastosować $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, przy czym
$m_{b(x)}$ = wartość ślepej próby w dniu x,
$m_{t(x)}$ = wartość badanej substancji w dniu x.

▼M6

C.43. BIODEGRADOWALNOŚĆ BEZTLENOWA SUBSTANCJI ORGANICZNYCH W PRZEFERMENTOWANYM OSADZIE: ZA POMOCĄ POMIARU WYTWARZANEGO GAZU

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 311 (2006 r.) w sprawie badań. Istnieje wiele badań umożliwiających ocenę biodegradowalności tlenowej substancji organicznych (metody badawcze C.4, C.9, C.10, i C.11 (1) oraz wytyczna OECD nr 302C w sprawie badań (2)), a wyniki ich stosowania wykorzystano z powodzeniem w celu przewidywania losów substancji w środowisku aerobowym, w szczególności podczas tlenowych etapów oczyszczania ścieków. Tlenowemu rozkładowi ulegają również w różnych proporcjach substancje nierozpuszczalne w wodzie, jak również te, które ulegają adsorbcji na substancjach stałych w ściekach, ponieważ występują w zdekantowanych ściekach. Większe frakcje tych substancji są jednak związane ze wstępnie osadzonym osadem, który jest oddzielony od surowych ścieków w osadnikach zanim zdekantowane ścieki, czyli supernatant, zostaną poddane oczyszczaniu w warunkach aerobowych. Osad zawierający niektóre substancje rozpuszczalne w płynie porowym przekierowuje się do podgrzewanych komór fermentacyjnych w celu poddania ich procesowi fermentacji beztlenowej. Na razie w tej serii nie ma badań umożliwiających ocenę biodegradowalności beztlenowej w beztlenowych komorach fermentacyjnych i niniejsze badanie zaprojektowano, aby wypełnić tę lukę; nie musi ono mieć zastosowania do innych beztlenowych elementów środowiska.

2. W celu oceny biodegradowalności beztlenowej zastosowano z powodzeniem metody respirometryczne wykorzystywane do pomiaru ilości wytworzonego gazu, głównie metanu (CH_4) i dwutlenku węgla (CO_2) w warunkach beztlenowych. Birch et al (3) dokonali przeglądu tych procedur i doszli do wniosku, że prace Sheltona i Tiedje (4) oparte na wcześniejszych badaniach (5)(6)(7) były najbardziej wyczerpujące. Metoda (4), nad którą inni kontynuowali prace (8) i która stała się amerykańską normą (9)(10), nie rozwiązywała problemów związanych z różną rozpuszczalnością CO_2 i CH_4 w środowisku badania i z obliczaniem teoretycznego wytwarzania gazu przez badaną substancję. W raporcie ECETOC (3) zalecono dodatkowy pomiar zawartości rozpuszczonego węgla nieorganicznego w supernatancie, co sprawiło, że technika ta znalazła szersze zastosowanie. Metoda ECETOC została poddana międzynarodowej próbnej kalibracji (badaniu międzylaboratoryjnemu) i stała się normą ISO 11734 (11).

3. Niniejsza metoda badawcza, oparta na normie ISO 11734 (11), opisuje metodę badania przesiewowego mającego na celu ocenę potencjalnej beztlenowej biodegradowalności substancji organicznych w szczególnych warunkach (tj. w beztlenowej komorze fermentacyjnej w danym czasie i danym zakresie stężenia mikroorganizmów). Ponieważ rozcieńczony osad jest stosowany przy stosunkowo wysokim stężeniu badanej substancji, a czas trwania badania jest zwykle dłuższy niż czas retencji w beztlenowych komorach fermentacyjnych, warunki badania niekoniecznie muszą odpowiadać warunkom panującym w beztlenowych komorach fermentacyjnych i nie mają też zastosowania do oceny biodegradowalności beztlenowej substancji organicznych w innych warunkach środowiskowych. Osad poddaje się narażeniu na działanie badanej substancji przez okres do 60 dni, co przekracza zwykły czas retencji osadu (25–30 dni) w beztlenowych komorach fermentacyjnych, choć czas retencji w obiektach przemysłowych może być znacznie dłuższy. Nie można sformułować równie przekonujących prognoz na podstawie wyników tego badania jak w przypadku biodegradacji tlenowej, ponieważ zgromadzone dowody dotyczące zachowania substancji badanych w „szybkich" badaniach tlenowych i w badaniach symulacyjnych oraz w środowisku tlenowym wystarczają, aby mieć pewność, że istnieje powiązanie; w przypadku środowiska beztlenowego istnieje niewiele podobnych dowodów. Można założyć, że całkowita biodegradacja beztlenowa zachodzi

▼M6

wówczas, gdy teoretyczne wytwarzanie gazu osiągnie poziom 75–80 %. Wysokie wartości stosunku substancji do biomasy zastosowane w niniejszym badaniu oznaczają, że substancja, która przechodzi dalej, będzie bardziej podatna na degradację w beztlenowej komorze fermentacyjnej. Ponadto substancje, które nie przekształcą się w gaz podczas badania, nie muszą wcale utrzymywać się przy wartościach stosunku substancji do biomasy w bardziej realnych warunkach środowiskowych. Zachodzą również inne reakcje beztlenowe, w których substancje mogą ulec co najmniej częściowej degradacji, np. w wyniku odchlorowania, jednak w tym badaniu nie wykrywa się takich reakcji. Stosując specjalne metody analityczne w celu oznaczenia badanej substancji, można jednak monitorować jej zniknięcie (zob. pkt 6, 30, 44 i 53).

ZASADA BADANIA

4. Wypłukany przefermentowany osad ([1]) zawierający niskie (< 10 mg/l) stężenia węgla nieorganicznego rozcieńcza się w przybliżeniu dziesięciokrotnie do całkowitego stężenia zawiesiny ogólnej 1 g/l–3 g/l i inkubuje w temperaturze 35 °C ± 2 °C w szczelnie zamkniętych naczyniach z badaną substancją w stężeniu 20–100 mg C/l przez okres co najmniej 60 dni. Uwzględnia się pomiar aktywności osadu wykonując równoległe ślepe próby kontrolne, w których w środowisku badania znajduje się inokulum z osadu, ale bez badanej substancji.

5. Mierzy się wzrost ciśnienia fazy gazowej w naczyniach związany z wytwarzaniem dwutlenku węgla i metanu. W warunkach badania znaczna część wytworzonego CO_2 zostanie rozpuszczona w fazie ciekłej albo przekształcona w węglan lub wodorowęglan. Na końcu badania mierzy się zawartość węgla nieorganicznego.

6. Ilość węgla (nieorganicznego plus metanu) powstałego w wyniku biodegradacji badanej substancji oblicza się na podstawie ilości netto wytworzonego gazu i ilości netto węgla nieorganicznego powstałego w fazie ciekłej przekraczającej wartości w ślepych próbach kontrolnych. Zakres biodegradacji oblicza się na podstawie całkowitej ilości wytworzonego węgla nieorganicznego i węgla metanowego wyrażonej jako procent zmierzonej lub obliczonej ilości węgla dodanego jako badana substancja. Można śledzić przebieg biodegradacji, wykonując pośrednie pomiary samego wytwarzania gazu. Ponadto pierwotną biodegradację można oznaczyć, wykonując szczegółowe analizy na początku i na końcu badania.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI

7. Aby dokonać prawidłowej interpretacji wyników, należy znać cechy charakterystyczne badanej substancji, takie jak czystość, rozpuszczalność w wodzie, lotność i adsorpcja. Zawartość węgla organicznego (% w/w) badanej substancji musi być poznana na podstawie jej struktury chemicznej lub pomiaru. W przypadku lotnych badanych substancji przy podejmowaniu decyzji, czy badanie ma zastosowanie, pomocna jest zmierzona lub obliczona stała Henry'ego. Informacje na temat toksyczności badanej substancji dla bakterii beztlenowych są przydatne przy wyborze odpowiedniego badanego stężenia i przy interpretacji wyników wskazujących na słabą biodegradowalność. Zaleca się uwzględnienie próby kontrolnej z hamowaniem, chyba że wiadomo jest, że badana substancja nie jest inhibitorem aktywności mikroorganizmów beztlenowych (zob. pkt 21 i norma ISO 13641-1 (12)).

([1]) Przefermentowany osad to mieszanina osadu ściekowego powstałego w wyniku procesu osadzenia i osadu czynnego, którą inkubowano w beztlenowej komorze fermentacyjnej w temperaturze około 35 °C w celu zredukowania biomasy i zapachu oraz poprawienia parametrów odwadniania osadu. Składa się z połączenia beztlenowych bakterii fermentacyjnych i bakterii metanogennych wytwarzających dwutlenek węgla i metan (11).

▼M6

ZASTOSOWANIE METODY BADANIA

8. Metodę badawczą można stosować w przypadku substancji rozpuszczalnych w wodzie; można ją również stosować w przypadku substancji słabo rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie, pod warunkiem że stosuje się metodę dokładnego dawkowania, zob. np. norma ISO 10634 (13). Na ogół w przypadku substancji lotnych konieczne jest podejmowanie decyzji indywidualnie dla każdego przypadku. Muszą zostać podjęte specjalne środki, na przykład nieuwalnianie gazu w trakcie badania.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

9. W celu sprawdzenia procedury bada się substancję odniesienia, przygotowując równolegle odpowiednie naczynia w ramach zwykłych serii badania. Przykładami użytych substancji są: fenol, benzoesan sodu i glikol polietylenowy 400, w stosunku do których oczekuje się, że ich degradacja nastąpi w wyniku teoretycznego wytwarzania gazu (tj. metanu i węgla nieorganicznego) w ilości ponad 60 % w ciągu 60 dni (3)(14).

ODTWARZALNOŚĆ WYNIKÓW BADAŃ

10. W międzynarodowym badaniu międzylaboratoryjnym (14) osiągnięto dobrą odtwarzalność pomiarów ciśnienia gazu między trzema naczyniami. Względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności) wynosił głównie poniżej 20 %, choć wartość ta często wzrastała do > 20 % w obecności substancji toksycznych lub pod koniec 60-dniowego okresu inkubacji. Wyższe odchylenia stwierdzono również w naczyniach o objętości < 150 ml. Ostateczne wartości pH środowiska badawczego znajdowały się w przedziale 6,5–7,0.

11. W badaniu międzylaboratoryjnym otrzymano następujące wyniki.

Badana substancja	Łączne dane n_1	Średnia degradacja (łącznych danych) (%)	Względne odchylenie standardowe (łącznych danych) (%)	Dane ważne n2	Średnia degradacja (danych ważnych) (%)	Względne odchylenie standardowe (danych ważnych) (%)	Dane > 60 % degradacja w badaniach ważnych n_3
Kwas palmitynowy	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Glikol polietylenowy 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Proporcja n_2

12. Współczynniki zmienności średniej wszystkich wartości otrzymanych z wykorzystaniem kwasu palmitynowego i glikolu polietylenowego 400 wynosiły odpowiednio 45 % (n = 36) i 35 % (n = 38). Kiedy pominięto wartości < 40 % i > 100 % (uznano, że te pierwsze wynikały z warunków gorszych od optymalnych, zaś te drugie wynikały z nieznanych przyczyn), współczynniki zmienności obniżyły się odpowiednio do 26 % i 23 %. Odsetki „ważnych” wartości osiągających co najmniej 60 % degradacji wynosiły 70 % w przypadku kwasu palmitynowego i 83 % w przypadku glikolu polietylenowego 400. Proporcje procentowej biodegradacji z pomiarów zawartości rozpuszczonego węgla nieorganicznego były stosunkowo niskie, ale zmienne. W przypadku kwasu palmitynowego, zakres wynosił 0–35 %, średnia 12 %, a współczynnik zmienności 92 %, natomiast w przypadku glikolu polietylenowego 400 zakres wynosił 0–40 %, średnia 24 %, a współczynniku zmienności 54 %.

OPIS METODY BADAWCZEJ

Aparatura

13. Wymagany jest zwykły sprzęt laboratoryjny i następujące przyrządy:

a. Inkubator – iskrobezpieczny z regulacją temperatury 35 °C ± 2 °C;

▼M6

b. Szklane naczynia badawcze odporne na ciśnienie o odpowiednich nominalnych wymiarach ([1]), każde z nich wyposażone w gazoszczelny korek, który może wytrzymać ciśnienie około 2 barów. Faza gazowa powinna stanowić od około 10 % do 30 % całkowitej objętości. Jeżeli biogaz jest uwalniany regularnie, około 10 % objętości fazy gazowej jest odpowiednie, jednak jeżeli uwolnienie gazu zachodzi tylko na końcu badania, odpowiednie jest 30 %. Szklane butelki do surowicy o pojemności nominalnej 125 ml i objętości całkowitej około 160 ml, zamknięte szczelnymi korkami ([2]) i obciskanymi pierścieniami aluminiowymi zaleca się w przypadkach, gdy następuje spadek ciśnienia przy każdym pobieraniu próbek;

c. Urządzenie do pomiaru ciśnienia ([3]) dostosowane w sposób umożliwiający pomiar i upuszczanie wytworzonego gazu, na przykład ręczny precyzyjny ciśnieniomierz podłączony do odpowiedniej igły do strzykawki; gazoszczelny zawór 3-drogowy ułatwia obniżenie nadmiernego ciśnienia (dodatek 1). Wewnętrzna objętość przewodów przetwornika ciśnienia i zaworu powinna być jak najmniejsza, aby błędy wynikające z pominięcia objętości aparatury były niewielkie;

Uwaga – Odczyty ciśnienia stosuje się bezpośrednio do obliczenia ilości węgla wytworzonego w fazie gazowej (pkt 42–44). Ewentualnie można przeliczyć odczyty ciśnienia na objętości (w temperaturze 35 °C i ciśnieniu atmosferycznym) wytworzonego gazu z wykorzystaniem krzywej konwersji. Krzywą tą konstruuje się z danych uzyskanych przez wstrzykiwanie znanych objętości azotu do szeregu naczyń badawczych (np. butelek do surowicy) w temperaturze 35 ° +/– 2° i zapisywanie otrzymanych odczytów ustabilizowanego ciśnienia (zob. dodatek 2). Obliczenia te zostały przedstawione w uwadze w pkt 44.

Uwaga – Należy unikać skaleczeń igłą podczas używania mikrostrzykawek.

d. Analizator węglowy nadający się do bezpośredniego oznaczania węgla nieorganicznego w zakresie od 1 mg/l do 200 mg/l;

e. Strzykawki o dużej precyzji do pobierania próbek gazowych i ciekłych;

f. Mieszadła magnetyczne i krzywki (nieobowiązkowe);

g. Komora rękawicowa (zalecana).

Odczynniki

14. W całym badaniu należy stosować odczynniki do analiz.

([1]) Zalecana pojemność to 0,1–1 litra.

([2]) Zaleca się stosowanie gazoszczelnych korków silikonowych. Zaleca się również przetestowanie gazoszczelności korków, w szczególności butylowych korków gumowych, ponieważ niektóre korki dostępne w handlu nie są wystarczająco gazoszczelne w przypadku metanu, a niektóre korki nie zachowują szczelności, kiedy przekłuje się je igłą w warunkach badania.

([3]) Urządzenie należy stosować i kalibrować w regularnych odstępach czasu zgodnie z instrukcją producenta. W przypadku zastosowania ciśnieniomierza o zalecanej jakości, np. wyposażonego w stalową membranę, nie jest potrzebna żadna kalibracja w laboratorium. Dokładność kalibracji można sprawdzić w laboratorium za pomocą jednopunktowego pomiaru pod ciśnieniem 1×10^5 Pa w oparciu o ciśnieniomierz z odczytem mechanicznym. Jeżeli ciśnienie w tym punkcie zostanie zmierzone poprawnie, liniowość również pozostanie niezmieniona. Jeżeli stosuje się inne urządzenia pomiarowe (bez kalibracji certyfikowanej przez producenta), kalibrację zaleca się przeprowadzać w całkowitym zakresie w regularnych odstępach czasu.

▼M6

Woda

15. Woda destylowana lub dejonizowana (odtleniona przez barbotaż azotem zawierającym mniej niż 5 µl/l tlenu), zawierająca mniej niż 2 mg/l rozpuszczonego węgla organicznego.

Środowisko badania

16. Należy przygotować czynnik rozcieńczający, zawierający następujące składniki w podanych ilościach;

Bezwodny diwodoroortofosforan potasu (KH_2PO_4)	0,27
Dwunastowodny wodorofosforan disodu ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	1,12
Chlorek amonu (NH_4Cl)	0,53
Dwuwodny chlorek wapnia ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075 g
Sześciowodny chlorek magnezu ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10
Czterowodny chlorek żelaza(III) ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02
Resazuryna (wskaźnik tlenu)	0,001 g
Dziewięciowodny siarczek sodu ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10
Roztwór podstawowy pierwiastków śladowych (nieobowiązkowy, pkt 18)	10 ml
Dodać odtlenioną wodę (pkt 15)	do 1 litra

Uwaga: aby zapewnić wystarczającą zdolność redukowania, należy stosować siarczek sodu, który jest świeżo dostarczony lub wypłukany i osuszony przed zastosowaniem. Badanie można prowadzić bez stosowania komory rękawicowej (zob. pkt 26). W tym przypadku końcowe stężenie siarczku sodu w środowisku należy zwiększyć do 0,20 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ na litr. Siarczek sodu można też dodać z odpowiedniego beztlenowego roztworu podstawowego przez korki zamkniętych naczyń badawczych, ponieważ taka procedura zmniejsza ryzyko utleniania. Siarczek sodu można zastąpić cytrynianem tytanu(III), który dodaje się przez korki zamkniętych naczyń badawczych w końcowym stężeniu 0,8–1,0 mmol/l. Cytrynian tytanu(III) stanowi wysoce skuteczny środek redukujący o niskiej toksyczności, który przygotowuje się w następujący sposób: rozpuścić 2,94 g dwuwodnego cytrynianu trisodowego w 50 ml odtlenionej wody (uzyskując roztwór 200 mmol/l) i dodać 5 ml 15 % (m/v) roztworu chlorku tytanu(III). Zneutralizować do pH 7 ± 0,2 za pomocą mineralnych zasad i wlać do odpowiedniego naczynia w strumieniu azotu. Stężenie cytrynianu tytanu(III) w tym roztworze podstawowym wynosi 164 mmol/l.

17. Wymieszać składniki środowiska badania, z wyjątkiem środka redukującego (siarczku sodu, cytrynianu tytanu) i przez 20 minut tuż przed zastosowaniem przepuszczać przez roztwór azotu, aby usunąć tlen. Następnie należy dodać właściwą objętość świeżo przygotowanego roztworu środka redukującego (przygotowanego w odtlenionej wodzie) tuż przed zastosowaniem środowiska badawczego. W razie potrzeby skorygować pH środowiska, używając w tym celu rozcieńczonego kwasu mineralnego lub rozcieńczonej zasady mineralnej do 7 ± 0,2.

▼M6

Roztwór podstawowy pierwiastków śladowych (nieobowiązkowy)

18. Zaleca się, aby środowisko badania zawierało następujące pierwiastki śladowe w celu poprawienia przebiegu procesów degradacji beztlenowej, w szczególności jeżeli stosuje się niskie stężenia inokulum (np. 1 g/l) (11).

Czterowodny chlorek manganu ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Kwas borowy (H_3BO_3)	5 mg
Chlorek cynku ($ZnCl_2$)	5 mg
Chlorek miedzi(II) ($CuCl_2$)	3 mg
Dwuwodny molibdenian sodu (II) ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Sześciowodny chlorek kobaltu ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Sześciowodny chlorek niklu ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Selenian disodu (Na_2SeO_3)	5 mg
Dodać odtlenioną wodę (pkt 15)	do 1 litra

Badana substancja

19. Badaną substancję należy dodać jako roztwór podstawowy, zawiesinę, emulsję lub bezpośrednio w postaci stałej lub ciekłej, lub wchłoniętej na filtrze z włókna szklanego, aby wytworzyć stężenie węgla organicznego nie większe niż 100 mg/l. W przypadku użycia roztworów podstawowych, przygotować odpowiedni roztwór w wodzie (pkt 15) (uprzednio odtlenioną za pomocą barbotażu azotem) o takim stężeniu, aby dodana objętość wynosiła mniej niż 5 % całkowitej objętości mieszaniny reakcyjnej. W razie potrzeby skorygować pH roztworu podstawowego do 7 ± 0,2. W odniesieniu do badanych substancji, które są niewystarczająco rozpuszczalne w wodzie, zob. norma ISO 10634 (13). W przypadku zastosowania rozpuszczalnika należy przygotować dodatkową próbę kontrolną, w której rozpuszczalnik dodaje się tylko do zaszczepionego środowiska. Należy unikać rozpuszczalników organicznych, o których wiadomo, że hamują wytwarzanie metanu (takich jak chloroform i tetrachlorek węgla).

Uwaga – Zachować ostrożność w przypadku badanych substancji, które są toksyczne, lub których właściwości nie są znane.

Substancje odniesienia

20. Substancje odniesienia, takie jak benzoesan sodu, fenol i glikol polietylenowy 400, zostały zastosowane z powodzeniem w celu sprawdzenia procedury i uległy degradacji w ponad 60 % w ciągu 60 dni. Przygotować roztwór podstawowy (w odtlenionej wodzie) wybranej substancji odniesienia w taki sam sposób jak w przypadku substancji badanej i w razie potrzeby skorygować pH do 7 ± 0,2.

Próba kontrolna z hamowaniem (warunkowa)

21. Aby uzyskać informacje na temat toksyczności badanej substancji dla mikroorganizmów beztlenowych w celu ustalenia najbardziej odpowiedniego badanego stężenia, do naczynia zawierającego środowisko badania należy dodać badaną substancję i substancję odniesienia (zob. pkt 16), przy czym każda z nich ma mieć takie samo stężenie przy dodawaniu (zob. pkt 19 i 20 oraz norma ISO13641-1 (12)).

▼M6

Przefermentowany osad

22. Przefermentowany osad należy pobrać z komory fermentacyjnej oczyszczalni ścieków, w której oczyszczane są głównie ścieki domowe. Należy w pełni scharakteryzować osad i zamieścić podstawowe informacje w sprawozdaniu (zob. pkt 54). Jeżeli przewiduje się zastosowanie zaadaptowanego inokulum, można brać pod uwagę wykorzystanie przefermentowanego osadu z oczyszczalni ścieków przemysłowych. Do pobierania przefermentowanego osadu używać butelek z szeroką szyjką, wykonanych z polietylenu o dużej gęstości lub podobnego materiału, który może się rozszerzać. Napełnić butelki osadem do wysokości około 1 cm od wylotu butelek i szczelnie zamknąć, najlepiej używając do tego celu zaworu bezpieczeństwa. Po przewiezieniu do laboratorium zebrany osad można użyć bezpośrednio lub umieścić w laboratoryjnej komorze fermentacyjnej. Uwolnić nadmiar biogazu, ostrożnie otwierając butle z osadem. Jako źródło inokulum można ewentualnie zastosować osad beztlenowy wytworzony w laboratorium, jednak jego zakres działania może ulec pogorszeniu.

Uwaga – Przefermentowany osad wytwarza łatwopalne gazy, które stwarzają ryzyko pożaru i wybuchu: zawiera również potencjalnie patogenne organizmy, dlatego mając do czynienia z osadem należy zachować właściwe środki ostrożności. Ze względów bezpieczeństwa do pobierania osadu nie stosować szklanych naczyń.

23. Aby ograniczyć wytwarzanie gazu w tle i zmniejszyć wpływ ślepych prób kontrolnych, można rozważyć wstępne fermentowanie osadu. Jeżeli wymagana jest wstępna fermentacja, należy osad fermentować w temperaturze 35 °C ± 2 °C przez okres do 7 dni, nie dodając do niego żadnych składników odżywczych ani substratów. Ustalono, że wstępna fermentacja prowadzona przez około 5 dni zwykle prowadzi do optymalnego zmniejszenia wytwarzania gazu w ślepej próbie bez niedopuszczalnego zwiększania okresów zwłoki lub inkubacji podczas fazy badania lub utraty działania w stosunku do niewielkiej liczby badanych substancji.

24. W przypadku badanych substancji, które są, lub co do których oczekuje się, że są słabo biodegradowalne, należy uwzględnić wstępne narażenie osadu na działanie badanej substancji w celu otrzymania lepiej dostosowanego inokulum. W takim przypadku należy dodać badaną substancję w stężeniu odpowiadającym stężeniu węgla organicznego na poziomie 5 mg/l–20 mg/l do przefermentowanego osadu i inkubować przez okres do 2 tygodni. Osad wstępnie narażony na działanie badanej substancji należy dokładnie opłukać przed użyciem (zob. pkt 25) i podać w sprawozdaniu z badania warunki wstępnego narażenia.

Inokulum

25. Opłukać osad (zob. pkt 22–24) tuż przed użyciem, aby obniżyć stężenie węgla nieorganicznego w końcowej zawiesinie do poziomu poniżej 10 mg/l. Odwirować osad w szczelnie zamkniętych probówkach (np. 3 000 g przez 5 min) i zlać supernatant. Otrzymany osad zawiesić w odtlenionym środowisku (pkt 16 i 17), ponownie odwirować zawiesinę i zlać supernatant. Jeżeli zawartość węgla nieorganicznego nie została wystarczająco obniżona, procedurę płukania osadu można powtórzyć maksymalnie dwa razy. Wydaje się, że nie ma to niekorzystnego wpływu na mikroorganizmy. Na koniec należy zawiesić osad w wymaganej objętości środowiska badania i oznaczyć zawiesinę ogólną [np. ISO 11923 (15)]. Końcowe stężenie zawiesiny ogólnej w naczyniach badawczych powinno mieścić się w zakresie 1 g/l–3 g/l (lub około 10 % tej wartości w nierozcieńczonym przefermentowanym osadzie). Powyższe operacje prowadzić w taki sposób, aby kontakt osadu z tlenem był minimalny (np. w atmosferze azotu).

▼M6

PROCEDURA BADANIA

26. Wykonać następujące wstępne procedury z zastosowaniem technik mających na celu utrzymanie kontaktu między przefermentowanym osadem i tlenem na możliwie najniższym poziomie; może na przykład zajść konieczność pracy w komorze rękawicowej w atmosferze azotu lub oczyszczania butli azotem (4).

Przygotowanie prób badanych i prób kontrolnych

27. Przygotować co najmniej trzy egzemplarze naczyń badawczych (zob. pkt 13 b) na badaną substancję, ślepe próby kontrolne, substancje odniesienia, próby kontrolne z hamowaniem (warunkowe) i komory kontroli ciśnienia (procedura nieobowiązkowa) (zob. pkt 7, 19 i 21). Można również przygotować dodatkowe naczynia w celu oceny pierwotnej biodegradacji z zastosowaniem szczegółowych analiz badanej substancji. Można wykorzystać ten sam zestaw ślepych prób kontrolnych dla kilku badanych substancji w tym samym badaniu, pod warunkiem że objętości fazy gazowej są stałe.

28. Przygotować rozcieńczone inokulum przed dodaniem go do naczyń, np. za pomocą pipety z szerokim wylotem. Dodać podwielokrotności dobrze wymieszanego inokulum (pkt 25), tak aby stężenie zawiesiny ogólnej było takie samo we wszystkich naczyniach (między 1 g/l i 3 g/l). W razie potrzeby dodać roztwory podstawowe do substancji badanej i substancji odniesienia po skorygowaniu pH do 7 ± 0,2. Badaną substancję i substancję odniesienia należy dodać przy użyciu najbardziej odpowiedniej drogi wprowadzania (pkt 19).

29. Badane stężenie węgla organicznego powinno normalnie wynosić 20–100 mg/l (pkt 4). Jeżeli badana substancja jest toksyczna, badane stężenie należy obniżyć do 20 mg C/l, a nawet niższego poziomu, jeżeli ma być mierzona tylko pierwotna biodegradacja za pomocą szczegółowych analiz. Należy zauważyć, że zmienność wyników badania zwiększa się przy niższych badanych stężeniach.

30. W przypadku naczyń ze ślepymi próbami zamiast roztworu podstawowego zawiesiny lub emulsji należy dodać równoważną ilość nośnika stosowanego do dawkowania badanej substancji. Jeżeli badaną substancję wprowadzono wykorzystując filtry z włókna szklanego lub rozpuszczalniki organiczne, do ślepych prób należy dodać filtr lub równoważną objętość rozpuszczalnika, która została odparowana. Przygotować dodatkową kontrpróbę z badaną substancją w celu zmierzenia wartości pH. W razie potrzeby skorygować pH środowiska do 7 ± 0,2, używając rozcieńczonego kwasu mineralnego lub rozcieńczonej zasady mineralnej. Do wszystkich naczyń badawczych należy dodać takie same ilości substancji neutralizujących. Dodatki te nie powinny być konieczne, ponieważ wartości pH roztworów podstawowych badanej substancji i substancji odniesienia zostały już skorygowane (zob. pkt 19 i 20). Aby zmierzyć pierwotną biodegradację, należy pobrać właściwą próbkę z naczynia do kontroli pH lub z dodatkowego naczynia badawczego, a stężenie badanej substancji należy zmierzyć, stosując szczegółowe analizy. Jeżeli mieszaniny reakcyjne mają zostać wymieszane (nieobowiązkowo), do wszystkich naczyń można dodać powlekane magnesy.

31. Upewnić się, czy całkowita objętość cieczy V_l i objętość fazy gazowej V_h były takie same we wszystkich naczyniach; należy również zanotować i zapisać wartości V_l i V_h. Każde naczynie należy zamknąć gazoszczelnym korkiem i przenieść z komory rękawicowej (zob. pkt 26) do inkubatora (zob. pkt 13-a).

▼M6

Nierozpuszczalne substancje badane

32. Dodać odważone ilości substancji, które słabo rozpuszczają się w wodzie, bezpośrednio do przygotowanych naczyń. Jeżeli niezbędne jest zastosowanie rozpuszczalnika (zob. pkt 19), przenieść roztwór badanej substancji lub zawiesinę do pustych naczyń. W miarę możliwości odparować rozpuszczalnik, przepuszczając przez naczynia azot, a następnie dodając inne składniki, mianowicie rozcieńczony osad (pkt 25) i odtlenioną wodę, jeśli zajdzie potrzeba. Należy również przygotować dodatkową próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem (zob. pkt 19). W odniesieniu do innych metod dodawania nierozpuszczalnych substancji, zob. norma ISO 10634 (13). Płynne substancje badane można dawkować za pomocą strzykawki do całkowicie przygotowanych szczelnie zamkniętych naczyń, jeżeli przewiduje się, że początkowe pH nie przekroczy 7 ± 1, w przeciwnym razie należy dawkować je zgodnie z powyższym opisem (zob. pkt 19).

Inkubacja i pomiary ciśnienia gazu

33. Przygotowane naczynia należy inkubować w temperaturze 35 °C ± 2 °C przez około 1 h, aby je ustabilizować i uwolnić nadmiar gazu do atmosfery, na przykład potrząsając każdym naczyniem po kolei, wprowadzając igłę miernika ciśnienia (pkt 13-c) przez korek i otwierając zawór do momentu, gdy ciśnieniomierz wskaże zero. Jeżeli na tym etapie lub podczas dokonywania pomiarów pośrednich ciśnienie fazy gazowej jest niższe od atmosferycznego, należy wprowadzić azot w celu przywrócenia ciśnienia atmosferycznego. Zamknąć zawór (zob. pkt 13-c) i kontynuować inkubację bez dostępu światła, upewniając się, czy wszystkie części naczyń są utrzymywane w temperaturze fermentacji. Po inkubacji obserwować wszystkie naczynia przez 24–48 h. Odrzucić naczynia, których zawartość cechuje się wyraźnie różowym zabarwieniem supernatantu, tj. jeżeli resazuryna (zob. pkt 16) zmieniła kolor, wskazując na obecność tlenu (zob. pkt 50). Chociaż małe ilości tlenu mogą być tolerowane przez układ, wyższe stężenia mogą w znacznym stopniu uniemożliwić przebieg biodegradacji beztlenowej. Można zaakceptować sporadyczne odrzucenie pojedynczego naczynia z zestawu trzech naczyń, ale wystąpienie większej liczby nieprawidłowości musi pociągnąć za sobą zbadanie procedur doświadczalnych oraz powtórzeniem badania.

34. Ostrożnie wymieszać zawartość każdego z naczyń, mieszając lub wstrząsając przez kilka minut co najmniej 2 lub 3 razy w tygodniu oraz na krótko przed każdym pomiarem ciśnienia. Wstrząsanie prowadzi do ponownego uformowania się zawiesiny inokulum i zapewnia równowagę gazową. Wszystkie pomiary ciśnienia należy wykonywać szybko, ponieważ temperatura naczyń badawczych może ulec obniżeniu, co spowoduje fałszywe odczyty. Podczas pomiaru ciśnienia całe naczynie badawcze, w tym fazę gazową, należy utrzymywać w temperaturze fermentacji. Zmierzyć ciśnienie gazu, na przykład przekłuwając korek igłą strzykawki (pkt 13-c) połączoną z urządzeniem mierzącym ciśnienie. Należy zadbać, aby do igły strzykawki nie dostała się woda; w takim przypadku należy wysuszyć mokre części i podłączyć nową igłę. Ciśnienie należy mierzyć w milibarach (zob. pkt 42). Ciśnienie gazu w naczyniach można mierzyć okresowo, np. co tydzień, i ewentualnie wypuszczać nadmiar gazu do atmosfery. Ewentualnie ciśnienie mierzy się tylko na końcu badania w celu określenia ilości wyprodukowanego biogazu.

35. Zaleca się wykonywanie pośrednich odczytów ciśnienia gazu, ponieważ wzrost ciśnienia stanowi wskazówkę co do możliwego terminu zakończenia badania i umożliwia śledzenie kinetyki (zob. pkt 6).

▼M6

36. Zazwyczaj zakończenie badania następuje po okresie inkubacji wynoszącym 60 dni, chyba że krzywa biodegradacji uzyskana w wyniku pomiarów ciśnienia wcześniej osiągnęła stan równowagi, czyli stan, w którym osiągnięto maksymalny rozkład, a krzywa biodegradacji ma poziomy przebieg. Jeżeli wartość stanu równowagi wynosi mniej niż 60 %, interpretacja jest problematyczna, ponieważ wskazuje to, że tylko część cząsteczki została zmineralizowana lub że popełniony został błąd. Jeżeli pod koniec zwykłego okresu inkubacji wytwarzany jest gaz, ale stan równowagi nie został najwyraźniej osiągnięty, wówczas należy rozważyć przedłużenie badania w celu sprawdzenia, czy stan równowagi (> 60 %) zostanie osiągnięty.

Pomiar węgla nieorganicznego

37. Na końcu badania po ostatnim pomiarze ciśnienia gazu pozostawić osad do ustania. Otworzyć po kolei każde naczynie i natychmiast pobrać próbkę w celu określenia stężenia (mg/l) węgla nieorganicznego w supernatancie. Supernatantu nie należy odwirowywać ani filtrować, ponieważ spowodowałoby to niedopuszczalną stratę rozpuszczonego dwutlenku węgla. Jeżeli nie można wykonać analizy próbki płynu przy pobieraniu, należy umieścić ją w szczelnie zamkniętej fiolce, nie pozostawiając nad płynem wolnej przestrzeni na fazę gazową, schłodzonej do temperatury 4 °C, i przechowywać maksymalnie przez 2 dni. Po wykonaniu pomiaru węgla nieorganicznego zmierzyć i zanotować wartość pH.

38. Ewentualnie węgiel nieorganiczny w supernatancie można oznaczyć pośrednio, uwalniając rozpuszczony węgiel nieorganiczny jako dwutlenek węgla, który można zmierzyć w fazie gazowej. Po ostatnim pomiarze ciśnienia gazu wyrównać ciśnienie w każdym naczyniu badawczym do ciśnienia atmosferycznego. Zakwasić zawartość każdego z naczyń do około pH 1 dodając stężonego kwasu mineralnego (np.H_2SO_4) przez korek każdego szczelnie zamkniętego naczynia. Inkubować wstrząśnięte naczynia w temperaturze 35 °C ± 2 °C przez około 24 godziny i mierzyć ciśnienie wydzielonego dwutlenku węgla za pomocą ciśnieniomierza.

39. Dokonać podobnych odczytów w przypadku ślepych prób, substancji odniesienia oraz, jeśli zostały zastosowane, naczyń z próbami kontrolnymi z hamowaniem (zob. pkt 21).

40. W niektórych przypadkach, zwłaszcza jeżeli te same naczynia z próbami kontrolnymi stosowane są w odniesieniu do kilku badanych substancji, w razie potrzeby należy rozważyć pomiary pośrednich stężeń węgla nieorganicznego w naczyniach badawczych i naczyniach z próbami kontrolnymi. W takim przypadku na potrzeby wszystkich pośrednich pomiarów należy przygotować wystarczającą liczbę naczyń. Zaleca się raczej takie postępowanie zamiast pobierania wszystkich próbek tylko z jednego naczynia. To ostatnie można stosować tylko wtedy, jeśli nie uzna się wymaganej objętości do analizy rozpuszczonego węgla nieorganicznego za zbyt dużą. Pomiar rozpuszczonego węgla nieorganicznego należy wykonać po zmierzeniu ciśnienia gazu bez uwalniania nadmiaru gazu jak opisano poniżej:

— pobrać jak najmniejszą objętość próbek supernatantu za pomocą strzykawki przez korek bez otwierania naczynia i oznaczyć węgiel nieorganiczny w próbce;

— po pobraniu próbki nadmiar gazu zostaje uwolniony lub nie;

— należy zauważyć, że nawet niewielkie zmniejszenie objętości supernatantu (np. około 1 %) może spowodować znaczny wzrost objętości gazu (V_h) w fazie gazowej;

— równania (zob. pkt 44) koryguje się w razie potrzeby zwiększając V_h w równaniu 3.

▼M6

Szczegółowe analizy

41. Jeżeli ma zostać oznaczona pierwotna beztlenowa degradacja (zob. pkt 30), w celu przeprowadzenia szczgółowej analizy pobrać odpowiednią objętość próbki na początku i na końcu badania z naczyń zawierających badaną substancję. Po pobraniu należy pamiętać, że objętości fazy gazowej nad roztworem (V_h) i cieczy (V_l) ulegną zmianie, i uwzględnić ten fakt podczas obliczania wyników wytwarzania gazu. Ewentualnie próbki do celów szczegółowych analiz można pobrać z dodatkowych mieszanin sporządzonych wcześniej w tym celu (pkt 30).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

42. Z praktycznych względów ciśnienie gazu mierzy się w milibarach (1 mbar = 2 h Pa = 10 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), objętość w litrach, a temperaturę w stopniach Celsjusza.

Węgiel w fazie gazowej

43. Ponieważ zarówno 1 mol metanu, jak i 1 mol dwutlenku węgla zawiera 12 g węgla, masa węgla w danej objętości wydzielonego gazu może być wyrażona jako:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Równanie [1]}$$

gdzie:

m = masa węgla (mg) w danej objętości wydzielonego gazu;

12 = względna masa atomowa węgla;

n = liczba moli gazu w danej objętości.

Jeżeli wytworzony został w znacznych ilościach gaz inny niż metan lub dwutlenek węgla (np. N_2O), należy dostosować wzór [1] w celu uwzględnienia ewentualnych skutków wywołanych przez wytworzone gazy.

44. Na podstawie praw gazowych n można opisać jako:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Równanie [2]}$$

gdzie:

p = ciśnienie gazu (w paskalach);

V = objętość gazu (m^3);

R = stała molowa gazu [8,314J/(mol K)];

T = temperatura inkubacji (w kelwinach).

W wyniku połączenia równań [1] i [2] oraz wykasowania niewymierności, aby uwzględnić wytwarzania gazu w ślepej próbie kontrolnej:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Równanie [3]}$$

gdzie:

m_h = masa węgla netto wytworzonego jako gaz w fazie gazowej (mg);

Dp = średnia różnica między początkowym i końcowym ciśnieniem w naczyniach badawczych minus odpowiadająca im średnia w naczyniach ze ślepą próbą (milibary);

▼M6

V_h = objętość fazy gazowej w naczyniu (l);

0,1 = zamiana newtonów/m^2 na milibary, a m^3 na litry.

Równanie [4] należy stosować w normalnej temperaturze inkubacji 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Równanie [4]}$$

Uwaga: alternatywna metoda obliczenia objętości. Odczyty ciśnieniomierza są przeliczane na ml wytworzonego gazu ze standardowej krzywej utworzonej w wyniku wykreślenia zależności wstrzykniętej objętości (ml) od odczytu ciśnieniomierza (dodatek 2). Liczbę moli (n) gazu w fazie gazowej w każdym naczyniu oblicza się, dzieląc sumaryczną produkcję gazu (ml) przez 25 286 ml/mol, co stanowi objętość zajmowaną przez jeden mol gazu w temperaturze 35 °C i przy standardowym ciśnieniu atmosferycznym. Ponieważ zarówno 1 mol CH_4, jak i 1 mol O_2 zawiera 12 g węgla, masa węgla (mg) w fazie gazowej (m_h) jest wyrażona Równaniem [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Równanie [5]}$$

Wykasowanie niewymierności w celu uwzględnienia wytwarzania gazu w ślepej próbie:

$$m_h = \frac{12\ 000 \times \Delta V}{25\ 286} = 0{,}475\Delta V \quad \text{Równanie [6]}$$

gdzie:

m_h = masa węgla netto wytworzonego jako gaz w fazie gazowej (mg);

DV = średnia różnica między objętością gazu wytworzonego w fazie gazowej w naczyniach badawczych oraz w naczyniach ślepej próby;

25286 = objętość zajmowana przez 1 mol gazu w temperaturze 35 °C, 1 atmosfera fizyczna.

45. W razie potrzeby przebieg biodegradacji można śledzić wykreślając skumulowany wzrost ciśnienia Δp (w milibarach) w funkcji czasu. Na podstawie tej krzywej można określić i zanotować fazę zwłoki (w dniach). Faza zwłoki jest to okres od rozpoczęcia badania do momentu rozpoczęcia znacznej degradacji (zob. np. dodatek 3). W przypadku pobrania i poddania analizie pośrednich próbek supernatantu (zob. pkt 40, 46 i 47) można uzyskać wykres całkowitego wytworzonego węgla (w gazie i w cieczy) zamiast samego sumarycznego ciśnienia.

Węgiel w cieczy

46. Nie uwzględnia się ilości metanu w cieczy, ponieważ jego rozpuszczalność w wodzie jest bardzo niska. Masę węgla nieorganicznego w cieczy w naczyniach badawczych oblicza się z równania [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Równanie [7]}$$

gdzie:

m_l = masa węgla nieorganicznego w cieczy (mg);

C_{net} = stężenie węgla nieorganicznego w naczyniach badawczych minus stężenie węgla nieorganicznego w naczyniach z próbą kontrolną na koniec badania (mg/l);

V_l = objętość cieczy w naczyniu (l).

▼M6

Całkowity węgiel zgazowany

47. Obliczyć całkowitą masę zgazowanego węgla w naczyniu, wykorzystując równanie [8]:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{Równanie [8]}$$

gdzie:

m_t = całkowita masa zgazowanego węgla (mg);

m_h and m_l zdefiniowane powyżej.

Węgiel w badanej substancji

48. Obliczyć masę węgla w naczyniach badawczych pochodzącego z dodanej substancji badanej z równania [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{Równanie [9]}$$

gdzie:

m_v = masa węgla w badanej substancji (mg);

C_c = stężenie węgla w badanej substancji w naczyniu badawczym (mg/l)

V_l = objętość cieczy w naczyniu badawczym (l).

Zakres biodegradacji

49. Obliczyć procentową wartość biodegradacji w fazie gazowej, stosując równanie [10], i całkowitą procentową wartość biodegradacji, stosując równanie [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{Równanie [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{Równanie [11]}$$

gdzie:

D_h = biodegradacja w fazie gazowej (%);

D_t = całkowita biodegradacja (%);

m_h, m_v and m_t zdefiniowane powyżej.

Stopień pierwotnej biodegradacji oblicza się na podstawie (nieobowiązkowych) pomiarów stężenia badanej substancji na początku i na końcu inkubacji z równania [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{Równanie [12]}$$

gdzie:

D_p = pierwotna degradacja badanej substancji (%);

S_i = początkowe stężenie badanej substancji (mg/l);

S_e = końcowe stężenie badanej substancji (mg/l).

Jeżeli metoda analizy wykaże znaczne stężenia badanej substancji w nieskorygowanym, beztlenowym osadzie inokulum, stosuje się równanie [13]:

▼M6

$$D_p^{\,1} = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \qquad \text{Równanie [13]}$$

gdzie:

$D_p^{\,1}$ = skorygowana pierwotna degradacja badanej substancji (%);

S_{ib} = początkowe „widoczne" stężenie badanej substancji w ślepych próbach kontrolnych (mg/l);

S_{eb} = końcowe „widoczne" stężenie badanej substancji w ślepych próbach kontrolnych (mg/l).

Ważność wyników

50. Należy wykorzystać jedynie odczyty ciśnienia z naczyń nie wykazujących różowego zabarwienia (zob. pkt 33). Zanieczyszczenie tlenem można zminimalizować, wykorzystując odpowiednie techniki postępowania z próbkami beztlenowymi.

51. Badanie należy uznać za ważne, jeżeli substancja odniesienia osiągnie stan równowagi, odpowiadający ponad 60 % biodegradacji ([1]).

52. Jeżeli na koniec badania pH przekroczyło zakres 7 ± 1 i nie doszło do wystarczającej biodegradacji, powtórzyć badanie ze zwiększoną pojemnością buforową środowiska.

Hamowanie degradacji

53. Zarówno w naczyniach zawierających badaną substancją, jak i w naczyniach z substancją odniesienia ilość wytwarzanego gazu powinna być co najmniej taka sama jak w naczyniach zawierających tylko substancję odniesienia; przeciwna sytuacja wskazuje na hamowanie wytwarzania gazu. W niektórych przypadkach wytwarzanie gazu w naczyniach zawierających badaną substancję bez substancji odniesienia będzie niższe niż w ślepych próbach kontrolnych, co wskazuje na hamujące działanie badanej substancji.

Sprawozdanie z badania

54. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

— nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna, numer CAS, wzór strukturalny i istotne właściwości fizykochemiczne;

— stopień czystości substancji badanej (zanieczyszczenia).

Warunki badania:

— objętość rozcieńczonej cieczy z komory fermentacyjnej (V_l) i fazy gazowej (V_h) w naczyniu;

— opis naczyń badawczych, główne cechy pomiaru biogazu (np. rodzaj ciśnieniomierza) i analizatora węgla nieorganicznego;

— dodanie badanej substancji i substancji odniesienia do układzu badawczego: zastosowane badane stężenie i każdorazowe zastosowanie rozpuszczalników;

— szczegółowe informacje dotyczące zastosowanego inokulum: nazwa oczyszczalni ścieków, opis źródła oczyszczonych ścieków (np. temperatura robocza, czas retencji osadu, głównie ścieki domowe itd.), stężenie, wszystkie informacje konieczne do uzasadnienia tych danych oraz informacje dotyczące wstępnego przygotowania inokulum (np. wstępna fermentacja, wstępne narażenie);

— temperatura inkubacji;

— liczba kontrprób.

([1]) Należy poddać to ponownej ocenie w przypadku uwzględnienia adsorpcyjnych i nierozpuszczalnych substancji chemicznych odniesienia.

▼M6

Wyniki:

— poziomy pH i węgla nieorganicznego na końcu badania;

— stężenie badanej substancji na początku i na końcu badania, jeżeli wykonano szczegółowy pomiar;

— w razie potrzeby wszystkie dane zmierzone w naczyniach badawczych, naczyniach ze ślepą próbą, naczyniach z substancją odniesienia, próbach kontrolnych z hamowaniem (np. ciśnienie w milibarach, stężenie węgla nieorganicznego (mg/l)) w formie tabeli (dane mierzone w fazie gazowej i w cieczy należy podawać osobno);

— statystyczna obróbka danych, czas trwania badania i wykres biodegradacji badanej substancji, substancji odniesienia i kontroli hamowania;

— procent biodegradacji badanej substancji i substancji odniesienia;

— uzasadnienie w przypadku ewentualnego odrzucenia wyników badania,

— omówienie wyników.

BIBLIOGRAFIA

(1) Następujące rozdziały niniejszego załącznika:

C.4 Oznaczanie szybkiej biodegradowalności;

C.9 Biodegradacja – test Zahn-Wellensa;

C.10 Symulacyjne badanie – w warunkach tlenowych w oczyszczalniach ścieków:

A: Zestawy osadu czynnego, B: Biofilmy

C.11, Biodegradacja – Zahamowanie oddychania osadu czynnego

(2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), Wytyczna OECD w sprawie badania chemikaliów, No. 302C, OECD, Paryż

(3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. i Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1 527–1 550. (opublikowane również jako sprawozdanie techniczne ECETOC nr 28 z czerwca 1988 r.).

(4) Shelton D.R. i 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. i McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485-492.

(6) Healy, J.B.Jr. i 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. Dokument roboczy, projekt 2, nr 35.24, Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów (ASTM), Filadelfia.

(8) Battersby, N.S. i 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, Filadelfia.

▼**M6**

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (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) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.

(13) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (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.

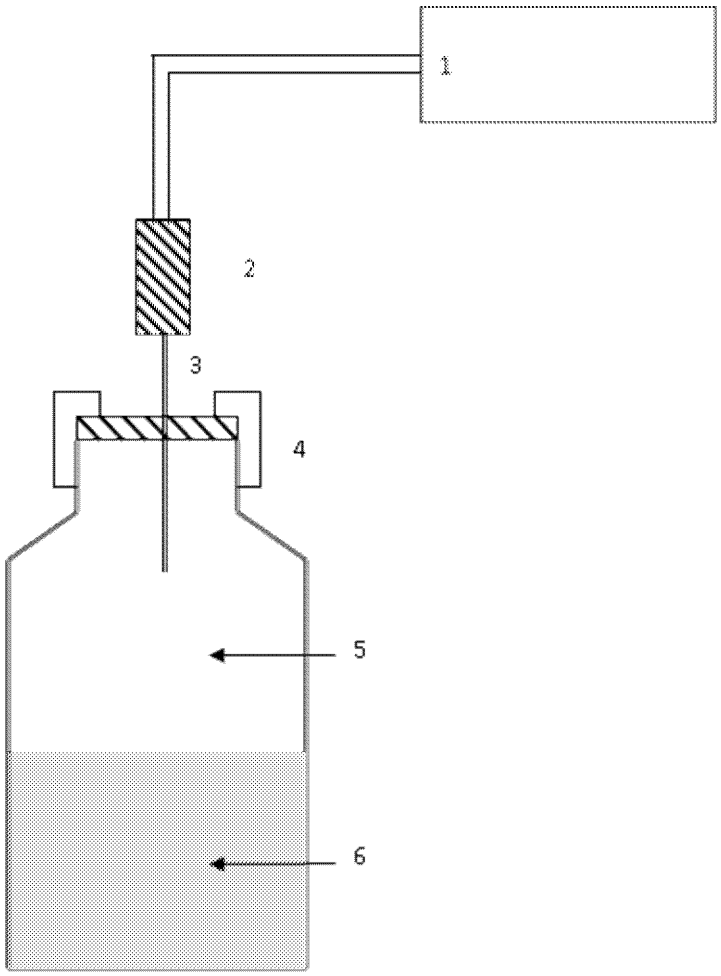
(14) Pagga, U. i Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.

(15) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Dodatek 1

Przykład aparatury do mierzenia wytwarzania biogazu na podstawie ciśnienia gazu



Legenda:

1 – Ciśnieniomierz

2 – Gazoszczelny zawór 3-drogowy

3 – Igła do strzykawki

4 – Gazoszczelna uszczelka (obciskana nasadka i korek)

5 – Faza gazowa nad cieczą (V_h)

6 – Inokulum z przefermentowanego osadu(V_l)

Naczynia badawcze w środowisku o temperaturze 35 °C ± 2 °C

▼M6

Dodatek 2

Przeliczanie odczytów ciśnieniomierza

Odczyty z ciśnieniomierza można powiązać z objętościami gazu, wykorzystując w tym celu krzywą standardową powstałą w wyniku wstrzykiwania znanych objętości powietrza w temperaturze 35 °C ± 2 °C do butelek na surowicę, zawierających objętość wody równą objętości mieszaniny reakcyjnej V_R:

— umieścić podwielokrotności V_R ml wody, utrzymywane w temperaturze 35 °C ± 2 °C, w pięciu butelkach na surowicę. Butelki szczelnie zamknąć i pozostawić na godzinę w łaźni wodnej w temperaturze 35 °C do stabilizacji;

— włączyć ciśnieniomierz, poczekać aż się ustabilizuje, i ustawić wartość zerową;

— wprowadzić igłę strzykawki przez korek jednej z butelek, otworzyć zawór i odczekać, aż ciśnieniomierz wskaże zero, po czym zamknąć zawór;

— procedurę tę należy powtórzyć dla pozostałych butelek;

— do każdej butelki wstrzyknąć 1 ml powietrza o temperaturze 35 °C ± 2 °C. Wprowadzić igłę (na mierniku) przez korek jednej z butelek i poczekać, aż odczyt ciśnienia ustabilizuje się. Zanotować ciśnienie, otworzyć zawór i odczekać, aż miernik ciśnienia wskaże zero, po czym zamknąć zawór;

— powtórzyć procedurę dla butelek;

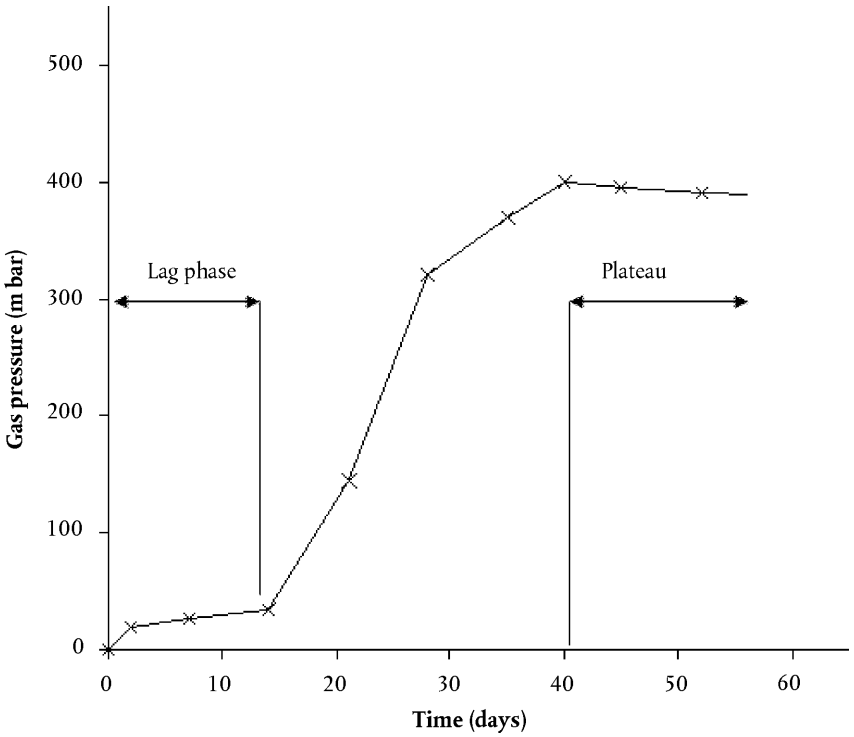
— powtórzy ć całą powyższą procedurę z zastosowaniem 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml i 50 ml powietrza;

— wykreślić krzywą konwersji ciśnienia (Pa) w funkcji objętości wstrzykniętego gazu Vb (ml). Dane wskazane przez instrument mają charakter liniowy w zakresie 0 Pa–70 000 Pa oraz 0 ml–50 ml wytwarzanego gazu.

▼**M6**

Dodatek 3

Przykład krzywej degradacji (sumaryczny wzrost ciśnienia netto)



▼M6

Dodatek 4

Przykład karty charakterystyki badania biodegradacji beztlenowej – Karta charakterystyki badanej substancji

Laboratorium: ..... Badana substancja: ..... Badanie nr: .....

Temperatura badania: (°C): ..... Objętość fazy gazowej (V_h): .....(l) Objętość cieczy (V_l): .....(l)

Węgiel w badanej substancji $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v (1): .....(mg)

Dzień	p_1 (badanie) (mbar)	p_2 (badanie) (mbar)	p_3 (badanie) (mbar)	p (badanie) średnia (mbar)	p_4 (ślepa próba) (mbar)	p_5 (ślepa próba) (mbar)	p_6 (ślepa próba) (mbar)	p (ślepa próba) średnia (mbar)	p (netto) badanie – ślepa próba średnia (mbar)	Δp (netto) sumarycznie (mbar)	m_h faza gazowa C (2) (mg)	D_h Biodegradacja (3) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ badanie (mg)	$C_{IC,\ 2}$ badanie (mg)	$C_{IC,\ 3}$ badanie (mg)	C_{IC} średnia arytmetyczna badania (mg)	$C_{IC,\ 4}$ ślepa próba (mg)	$C_{IC,\ 5}$ ślepa próba (mg)	$C_{IC,\ 6}$ ślepa próba (mg)	C_{IC} średnia arytmetyczna ślepej próby (mg)	$C_{IC,\ net}$ badanie – ślepa próba średnia (mg)	m_l C w cieczy (4) (mg)	m_t C ogółem (5) (mg)	D_t Biodegradacja (6) (%)
Węgiel nieorganiczny (koniec)												
pH (koniec)												

(1) Węgiel w naczyniu badawczym, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

(2) Węgiel w fazie gazowej, m_h w normalnej temperaturze inkubacji (35 °C): $m_h = 0{,}468 \times p \times V_h$

(3) Biodegradacja obliczona na podstawie gazu w fazie gazowej, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

(4) Węgiel płynny, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net}\ V_l$

(5) Całkowity węgiel zgazowany, m_t (mg): $m_t + m_l$

(6) Całkowita biodegradacja, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

02008R0440 — PL — 16.10.2019 — 008.001 — 2374

▼M6

Laboratorium: ..... Substancja odniesienia: ..... Badanie nr: .....

Temperatura badania: (°C): ..... Objętość fazy gazowej (V_h): .....(l) Objętość cieczy (V_l) (l): .....

Węgiel w substancji odniesienia$C_{c,v}$ (mg/l): ..... m_v ([1]) (mg):

Dzień	p_1 (ref.) (mbar)	p_2 (ref.) (mbar)	p_3 (ref.) (mbar)	p (ref.) średnia (mbar)	p_4 (zaham.) (mbar)	p_5 (zaham.) (mbar)	p_6 (zaham.) (mbar)	p (zaham.) średnia (mbar)	p (ref.) ref. – ślepa próba (mbar)	Δp (ref.) sumarycznie (mbar)	m_h C ([2]) w fazie gazowej (mg)	D_h Biodegradacja ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ ref. (mg)	C_{IC} średnia ref. (mg)	$C_{IC,\ 4}$ zaham. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ zaham. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ zaham. (mg)	C_{IC} średnie zaham. (mg)	$C_{IC,\ net}$ ref. – zaham. (mg)	m_l C w cieczy ([4]) (mg)	m_t C ogółem ([5]) (mg)	D_t Biodegradacja ([6]) (%)
Węgiel nieorganiczny (koniec)												
pH (koniec)												

([1]) Węgiel w naczyniu badawczym, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
([2]) Węgiel w fazie gazowej, m_h w normalnej temperaturze inkubacji (35 °C): $m_h = 0{,}468 \times p \times V_h$
([3]) Biodegradacja obliczona na podstawie gazu w fazie gazowej, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$
([4]) Węgiel w cieczy, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
([5]) Całkowity węgiel zgazowany, m_t (mg): $m_t + m_l$
([6]) Całkowita biodegradacja, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

▼M6

C.44. WYMYWANIE W KOLUMNACH GLEBOWYCH

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 312 (2004 r.) w sprawie badań. Sztuczne substancje chemiczne mogą docierać do gleby bezpośrednio w wyniku celowego wprowadzenia (np. agrochemikalia) lub drogami pośrednimi (np. przez ścieki → osady ściekowe → glebę lub powietrze → składowanie na mokro/sucho). Aby ocenić ryzyko związane z tymi substancjami chemicznymi, ważne jest oszacowanie ich potencjału w zakresie przemian w glebie oraz przemieszczania się (wymywania) do głębszych warstw gleby i ostatecznie do wód podziemnych.

2. Dostępnych jest kilka metod umożliwiających zmierzenie potencjału wymywania substancji chemicznych w glebie w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, tj. chromatografia cienkowarstwowa gleby, chromatografia grubowarstwowa gleby, chromatografia cieczowa gleby oraz pomiary adsorpcji/desorpcji (1)(2). W przypadku niezjonizowanych substancji chemicznych współczynnik podziału n-oktanol/woda (P_{ow}) umożliwia szybkie oszacowanie ich adsorpcji i potencjału wymywania (3)(4)(5).

3. Opisana tu metoda badawcza polega na chromatografii kolumnowej gleby o naruszonej strukturze (zob. definicja w dodatku 1). Przeprowadza się dwa rodzaje eksperymentów w celu oznaczenia (i) potencjału wymywania badanej substancji chemicznej, oraz (ii) potencjału wymywania produktów przemiany (badanie z zalegającymi pozostałościami) w glebach w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych ([1]). Metoda badawcza oparta jest na istniejących metodach (6)(7)(8)(9)(10)(11).

4. W trakcie warsztatów OECD na temat selekcji gleb/osadów zorganizowanych w Belgirate we Włoszech w 1995 r. (12), ustalono ilość i rodzaj gleb, które mają być stosowane na potrzeby tej metody badawczej. Opracowano również zalecenia dotyczące pobierania, obróbki i przechowywania próbek gleby w celu przeprowadzenia eksperymentów dotyczących wymywania.

ZASADA METODY BADANIA

5. Kolumny wykonane z odpowiedniego obojętnego materiału (np. szkła, stali nierdzewnej, aluminium, teflonu, polichlorku winylu itd.) wypełnia się glebą, a następnie nasyca ją i stabilizuje roztworem w formie „sztucznego deszczu” (zob. definicja w dodatku 1) i pozostawia do odsączenia. Następnie na powierzchnię gleby w każdej kolumnie wprowadza się badaną substancję chemiczną lub zalegające pozostałości badanej substancji chemicznej. Następnie kolumny glebowe nawadnia się sztucznym deszczem i zbiera odciek. Po zakończeniu procesu wymywania glebę wyjmuje się z kolumn i dzieli na odpowiednią liczbę segmentów, w zależności od informacji, które trzeba uzyskać na podstawie badania. Każdy segment gleby i odciek analizuje się następnie pod kątem badanej substancji chemicznej oraz, w stosownych przypadkach, pod kątem produktów przemiany lub innych substancji chemicznych będących przedmiotem zainteresowania.

STOSOWANIE METODY BADAWCZEJ

6. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych (nieoznakowanych lub oznakowanych izotopowo np. za pomocą ^{14}C), w odniesieniu do których istnieje metoda analityczna o wystarczającej dokładności i czułości. Niniejszej metody badawczej nie należy stosować w przypadku substancji chemicznych, które ulatniają się z gleby lub wody i w związku z tym nie utrzymują się w glebie lub odcieku w eksperymentalnych warunkach niniejszej metody badawczej.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

7. Do pomiaru działania wymywającego w kolumnach glebowych wykorzystać można nieoznakowane lub oznakowane izotopowo badane substancje chemiczne. Materiał oznakowany izotopowo jest wymagany w przypadku badania wymywania produktów przemiany (zalegających pozostałości badanej substancji chemicznej) i oznaczania bilansu masy. Do znkowania

([1]) Badania wymywania w kolumnie z użyciem środków ochrony roślin mogą stanowić źródło informacji na temat mobilności badanej substancji chemicznej i produktów jej przemiany oraz mogą uzupełnić statyczne badania sorpcji.

▼**M6**

zaleca się stosowanie ^{14}C, ale wykorzystać można również inne izotopy, takie jak ^{13}C,^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Na ile to możliwe, znacznik powinien być umieszczony w najbardziej stabilnych częściach cząsteczki. Czystość badanej substancji chemicznej powinna wynosić co najmniej 95 %.

8. Większość substancji chemicznych należy stosować jako substancje pojedyncze. W przypadku substancji czynnych zawartych w środkach ochrony roślin w celu zbadania wymywania macierzystej substancji badanej można jednak stosować postacie użytkowe, których zbadanie jest konieczne w szczególności wtedy, gdy mieszanina może wpłynąć na tempo uwalniania (np. postacie użytkowe granulowane lub o kontrolowanym uwalnianiu). Jeżeli chodzi o szczególne wymogi dotyczące projektu badania w odniesieniu do mieszanin, przed jego wykonaniem pomocna może okazać się konsultacja z organem regulacyjnym. W przypadku badań wymywania zalegających pozostałości, wykorzystać należy czystą macierzystą badaną substancję.

9. Przed przystąpieniem do wykonania badań wymywania w kolumnach glebowych, należałoby uzyskać następujące dane na temat badanej substancji chemicznej:

(1) rozpuszczalność w wodzie [metoda badawcza A.6] (13);

(2) rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych;

(3) prężność par [metoda badawcza A.4 (13) oraz] stała Henry'ego;

(4) współczynnik podziału n-oktanol/woda [metody badawcze A.8 i A.24] (13);

(5) współczynnik adsorpcji (K_d, K_f lub K_{OC}) [metody badawcze C.18 lub C.19] (13);

(6) hydroliza [metoda badawcza C.7] (13);

(7) stała dysocjacji (pK_a) [OECD TG 112] (25);

(8) tlenowa i beztlenowa przemiana w glebie [metoda badawcza C.23] (13).

Uwaga: temperaturę, w której pomiary te zostały wykonane, należy podać w odpowiednich sprawozdaniach z badania.

10. Ilość badanej substancji chemicznej wprowadzonej do kolumn glebowych powinna być wystarczająca, aby umożliwić wykrycie co najmniej 0,5 % zastosowanej dawki w każdym pojedynczym segmencie. W przypadku czynnych substancji chemicznych zawartych w środkach ochrony roślin ilość zastosowanych badanych substancji chemicznych może odpowiadać maksymalnej zalecanej dawce (pojedyncze zastosowanie).

11. Musi być dostępna odpowiednia metoda analityczna o znanej dokładności, precyzji i czułości do ilościowego oznaczania badanej substancji chemicznej oraz, w stosownych przypadkach, produktów jej przemiany w glebie i odcieku. Znana powinna być także analityczna granica wykrywalności badanej substancji chemicznej i jej istotnych produktów przemiany (zazwyczaj co najmniej wszystkich produktów przemiany $\geq$ 10 % zastosowanej dawki obserwowanej w badaniach dróg przemian, ale najlepiej wszystkich odnośnych istotnych produktów przemiany) (zob. pkt 17).

▼M6

CHEMICZNA SUBSTANCJA ODNIESIENIA

12. Chemiczne substancje odniesienia o znanym działaniu wymywającym, takie jak atrazyna lub monuron, które uznać można za substancje o średniej skłonności do wymywania w glebie, należy stosować w celu oceny względnego przemieszczania się badanej substancji chemicznej w glebie (1)(8)(11). W celu potwierdzenia hydrodynamicznych właściwości kolumny glebowej użyteczna może być również polarna chemiczna substancja odniesienia nie ulegająca sorpcji ani degradacji (np. tryt, bromek, fluoresceina, eozyna), umożliwiająca śledzenie przemieszczanie się wody w kolumnie.

13. Wzorce analityczne również mogą być przydatne do określenia właściwości lub tożsamości produktów przemiany znajdujących się w segmentach gleby i odciekach przy wykorzystaniu chromatografii, spektroskopii lub innych odpowiednich metod.

DEFINICJE I JEDNOSTKI

14. Zob. dodatek 1.

KRYTERIA JAKOŚCI

Odzysk

15. Suma procentowych ilości badanej substancji chemicznej znajdujących się w segmentach gleby i w odcieku z kolumny po zakończeniu procesu wymywania stanowi odzysk z eksperymentu wymywania. Odzysk powinien mieścić się w zakresie 90–110 % w odniesieniu do substancji chemicznych oznakowanych izotopowo (11) i 70–110 % w odniesieniu do nieoznakowanych substancji chemicznych (8).

Powtarzalność i czułość metody analitycznej

16. Powtarzalność metody analitycznej mającej na celu ilościowe określenie badanej substancji chemicznej i produktów przemiany można sprawdzić, stosując podwójną analizę tego samego ekstraktu z segmentu gleby lub odcieku (zob. pkt 11).

17. Granica wykrywalności metody analitycznej w odniesieniu do badanej substancji chemicznej i produktów przemiany powinna wynosić co najmniej 0,01 mg · kg^{-1} w przypadku każdego segmentu gleby lub odcieku (jako badanej substancji chemicznej) lub 0,5 % ilości wprowadzonej do któregokolwiek pojedynczego segmentu, w zależności od tego, która z tych wartości jest niższa. Należy określić granicę oznaczalności.

OPIS METODY BADAWCZEJ

Układ badawczy

18. W badaniu wykorzystywane są kolumny do wymywania (podzielne lub niepodzielne) wykonane z odpowiedniego obojętnego materiału (np. szkła, stali nierdzewnej, aluminium, teflonu, polichlorku winylu itd.), których wewnętrzna średnica wynosi co najmniej 4 cm, a wysokość co najmniej 35 cm. Materiał, z którego są wykonane kolumny, należy zbadać pod kątem ewentualnych interakcji z badaną substancją chemiczną lub produktami jej przemiany. Przykłady odpowiednich podzielnych i niepodzielnych kolumn przedstawione zostały w dodatku 2

19. Do wypełniania kolumny i ubijania w nich gleby stosuje się łyżkę, tłok i urządzenie wibracyjne.

20. W celu nawilżenia kolumn glebowych sztucznym deszczem można zastosować tłok lub pompy perystaltyczne, sitka natryskowe, butle Mariotte'a lub zwykłe wkraplacze.

▼M6

Wyposażenie laboratoryjne i substancje chemiczne

21. Wymagane jest standardowe wyposażenie laboratoryjne, w szczególności następujące urządzenia:

(1) sprzęt laboratoryjny, taki jak aparatura do GLC, HPLC i TLC, włącznie z odpowiednimi systemami detekcyjnymi do analizy oznakowanych i nieoznakowanych substancji chemicznych lub odwróconą metodą rozcieńczeń izotopowych;

(2) przyrządy do celów identyfikacji (np. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR itp.);

(3) scyntylator cieczowy dla badanych substancji chemicznych oznakowanych izotopowo;

(4) utleniacz do spalania oznakowanych materiałów

(5) aparatura do ekstrakcji (na przykład probówki wirówkowe do ekstrakcji na zimno i aparat ekstrakcyjny Soxhleta do ciągłej ekstrakcji z ogrzewaniem pod chłodnicą zwrotną);

(6) aparatura do zatężania roztworów i ekstraktów (np. wyparka rotacyjna),

22. Zastosowane substancje chemiczne obejmują: rozpuszczalniki organiczne do analizy, takie jak aceton, metanol itp.; ciecz scyntylacyjną; 0,01 roztwór M $CaCl_2$ w destylowanej lub dejonizowanej wodzie (= sztuczny deszcz).

Badana substancja chemiczna

23. Aby wprowadzić badaną substancję chemiczną do kolumny glebowej, należy rozpuścić ją w wodzie (dejonizowanej lub destylowanej). Jeżeli badana substancja chemiczna jest słabo rozpuszczalna w wodzie, można ją wprowadzić w postaci użytkowej produktu (w stosownych przypadkach po zawieszeniu lub emulgacji w wodzie) albo w dowolnym rozpuszczalniku organicznym. W przypadku zastosowania rozpuszczalnika organicznego należy ograniczyć jego ilość do minimum i odparować z powierzchni kolumny glebowej przed rozpoczęciem procedury wymywania. Postacie użytkowe w formie stałej, takie jak granulki, należy wprowadzać jako ciało stałe bez dodawania wody; aby umożliwić lepsze rozmieszczenie na powierzchni kolumny glebowej użytkowej postaci produktu, przed wprowadzeniem można go wymieszać z niewielką ilością piasku kwarcowego (np. 1 g).

24. Ilość badanej substancji chemicznej wprowadzonej do kolumn glebowych powinna być wystarczająca, aby umożliwić wykrycie co najmniej 0,5 % zastosowanej dawki w każdym pojedynczym segmencie. W przypadku czynnych substancji chemicznych zawartych w środkach ochrony roślin ilość ta może odpowiadać maksymalnej zalecanej dawce (pojedyncze zastosowanie), a w przypadku wymywania zarówno substancji macierzystej, jak i zalegających pozostałości, powinna być powiązana z powierzchnią zastosowanej kolumny glebowej ([1]).

Chemiczna substancja odniesienia

25. W badaniach wymywania należy zastosować chemiczną substancję odniesienia (zob. pkt 12). Należy ją wprowadzić na powierzchnię kolumny glebowej w podobny sposób jak badaną substancję chemiczną i w odpowiedniej dawce, umożliwiającej właściwe wykrycie albo jako wewnętrzny

([1]) Ilość, jaka ma być wprowadzona do cylindrycznych kolumn glebowych, można obliczyć na podstawie następującego wzoru:

$$M\ [\mu g] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^9[\mu g/kg] \cdot d^2[cm^2] \cdot \pi}{10^8[cm^2/ha] \cdot 4}$$

gdzie:
M = ilość zastosowana na kolumnę [μg]
A = zastosowana dawka [$kg \cdot ha^{-1}$]
d = średnica kolumny glebowej [cm]
π = 3,14

▼M6

wzorzec znajdujący się w tej samej kolumnie glebowej, co badana substancja chemiczna, albo oddzielnie w oddzielnej kolumnie glebowej. Zaleca się wprowadzenie obydwu substancji chemicznych w tej samej kolumnie poza przypadkami, w których obydwie substancje chemiczne są oznakowane w podobny sposób.

Gleby

Wybór gleby

26. W celu zbadania wymywania w odniesieniu do macierzystej badanej substancji chemicznej zastosować należy 3–4 rodzaje gleby różniące się pH, zawartością węgla organicznego i teksturą (12). Wytyczne dotyczące wyboru gleb do eksperymentów wymywania przedstawione zostały poniżej w Tabeli 1. W przypadku badanych substancji chemicznych ulegających jonizacji wybrane rodzaje gleby powinny obejmować szereg pH w celu oceny przemieszczania się substancji chemicznej w jej formie zjonizowanej i niezjonizowanej; co najmniej 3 rodzaje gleby powinny posiadać pH, w przypadku którego badana substancja chemiczna znajduje się w swojej mobilnej postaci.

Tabela 1

Wytyczne dotyczące wyboru rodzajów gleby do badań wymywania

Gleba nr	Wartość pH	Węgiel organiczny %	Zawartość gliny %	Tekstura (*)
1	>,.5	3,5 – 5,0	20 – 40	glina ilasta
2	5,5 – 7,0	1,5 – 3,0	15 – 25	pył ilasty
3	4,0 – 5,5	3,0 – 4,0	15 – 30	glina zwykła
4	< 4,0 – 6,0 §	< 0,5 – 1,5 § ‡	< 10 – 15 §	piasek gliniasty
5	< 4,5	> 10 #	< 10	piasek gliniasty/piasek

(*) Zgodnie z systemami FAO i Departamentu Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (14).

§ Wartości odpowiednich zmiennych powinny w miarę możliwości mieścić się w podanym zakresie. Jeżeli jednak wystąpią trudności ze znalezieniem odpowiedniego materiału glebowego, akceptuje się wartości poniżej wskazanego minimum.

‡ Gleby o zawartości węgla organicznego wynoszącej mniej niż 0,3 % mogą zaburzyć korelację między organiczną zawartością a adsorpcją. W związku z tym zaleca się stosować gleby o minimalnej zawartości węgla organicznego wynoszącej 0,3 %.

Gleby o bardzo wysokiej zawartości węgla (np. > 10 %) mogą nie być akceptowane przez organy regulacyjny, np. w przypadku rejestracji pestycydów.

27. Czasem niezbędne mogą być inne rodzaje gleb, aby reprezentowały chłodniejsze, umiarkowane i tropikalne regiony. W związku z tym, jeżeli zaleca się wykorzystanie innych rodzajów gleb, powinny one charakteryzować się takimi samymi parametrami i wykazywać podobne zmiany we właściwościach, jak opisane w wytycznych dotyczących wyboru gleby do badań wymywania (zob. tabela 1 powyżej), nawet jeżeli nie spełniają dokładnie kryteriów.

28. W przypadku badań wymywania z „zalegającymi pozostałościami” należy zastosować jedną glebę (12). Powinna ona zawierać > 70 % piasku i 0,5–1,5 % węgla organicznego (np. gleba nr 4 w Tabeli 1). Może być konieczne użycie większej liczby rodzajów gleby, jeżeli istotne są dane dotyczące produktów przemiany.

29. Wszystkie gleby należy scharakteryzować co najmniej w odniesieniu do tekstury [% piasku, % mułu, % gliny zgodnie z systemami klasyfikacji FAO i Departamentu Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (14)], pH, pojemności wymiany kationów, zawartości węgla organicznego, gęstości objętościowej (w przypadku gleby o naruszonej strukturze) oraz pojemności wodnej. Pomiar biomasy mikroorganizmów wymagany jest jedynie w przypadku gleby wykorzystywanej w okresie starzenia/inkubacji przed wykonaniem eksperymentu wymywania zalegających pozostałości. Przy interpretacji

▼M6

wyników tego badania mogą okazać się przydatne informacje dotyczące dodatkowych właściwości gleby (np. klasyfikacja gleby, mineralogia gliny, powierzchnia właściwa). W celu określenia właściwości gleby zastosować można metody zalecane w pozycjach bibliografii (15)(16)(17)(18)(19).

Gromadzenie i przechowywanie gleb

30. Gleby należy pobierać z górnej warstwy (A – poziom próchniczny) do maksymalnej głębokości 20 cm. Należy usunąć pozostałości roślinności, makrofauny i kamieni. Gleby (oprócz wykorzystanych do starzenia badanej substancji chemicznej) suszy się na powietrzu w temperaturze pokojowej (najlepiej 20–25 C). Rozdrobnienie powinno być przeprowadzane z minimalną siłą, tak aby pierwotna tekstura gleby uległa jak najmniejszym zmianom. Gleby przesiewa się przez sito o oczkach ≤ 2 mm. Zalecana jest staranna homogenizacja, gdyż poprawia ona odtwarzalność wyników. Przed użyciem gleby mogą być przechowywane w temperaturze otoczenia i suszone na powietrzu (12). Nie ma zalecanej granicy czasu przechowywania, lecz gleby przechowywane dłużej niż trzy lata powinny być ponownie przeanalizowane przed użyciem pod względem zawartości węgla organicznego i pH.

31. Powinny być dostępne szczegółowe informacje na temat historii obszarów, z których pobrana została badana próbka gleby. Szczegółowe informacje obejmują dokładną lokalizację [dokładnie określoną w układzie UTM (Universal Transverse Mercato-Projection/European Horizontal Datum) lub za pomocą współrzędnych geograficznych], pokrywę roślinną, zabiegi z użyciem środków ochrony roślin, stosowanie nawozów organicznych i nieorganicznych, dodatki materiału biologicznego lub przypadkowe zanieczyszczenia (12). Gleby, które były poddawane działaniu badanej substancji chemicznej lub jej strukturalnych analogów w ciągu ostatnich czterech lat, nie powinny być stosowane do badań wymywania.

Warunki badania

32. W trakcie badania kolumny glebowe wykorzystywane w badaniu wymywania należy przechowywać bez dostępu światła w temperaturze otoczenia, dopóki utrzymuje się ona w zakresie ± 2 °C. Zalecane temperatury mieszczą się w zakresie 18–25 °C.

33. Nawadnianie sztucznym deszczem (0,01 M $CaCl_2$) należy stosować w sposób ciągły na powierzchni kolumn glebowych w ilości 200 mm przez okres 48 godzin ([1]); ilość ta stanowi ekwiwalent zastosowania 251 ml w kolumnie o wewnętrznej średnicy wynoszącej 4 cm. Jeżeli jest to konieczne dla celów badania, można dodatkowo zastosować inne ilości sztucznego deszczu lub dłuższy okres trwania.

Wykonanie badania

Wymywanie w przypadku macierzystej badanej substancji chemicznej

34. Co najmniej dwie kolumny do wymywania wypełnia się niepoddaną działaniu substancji chemicznej, wysuszoną na powietrzu i przesianą glebą (< 2 mm) do wysokości około 30 cm W celu uzyskania jednolitego wypełnienia glebę dodaje się do kolumn w małych porcjach za pomocą łyżki i dociska tłokiem, jednocześnie delikatnie wibrując kolumnę do momentu, kiedy górna część słupa gleby już się nie obniża. Jednolite rozmieszczenie jest

([1]) Symuluje to niezmiernie wysoki opad deszczu. Na przykład w Europie Środkowej średni roczny poziom opadów mieści się w zakresie 800–1 000 mm.

▼M6

wymagane ze względu na uzyskanie odtwarzalnych wyników z kolumn do wymywania. W celu uzyskania szczegółowych informacji o technikach wypełniania kolumn glebą, zob. pozycje bibliografii (20), (21) i (22). Aby kontrolować odtwarzalność procedury wypełniania, wyznacza się całkowitą masę gleby umieszczonej w kolumnach ([1]); masa w kolumnach stanowiących duplikaty powinna być podobna.

35. Po wypełnieniu kolumny glebowe wstępnie nawilża się sztucznym deszczem (0,01 M $CaCl_2$) od dołu do góry w celu wyparcia powietrza z porów gleby przez wodę. Następnie kolumny glebowe pozostawia się do ustabilizowania, a nadmiar wody jest odprowadzany grawitacyjnie. Metody nasycenia kolumn przedstawione zostały w pozycji bibliografii (23).

36. Następnie do kolumn glebowych wprowadza się badaną substancję chemiczną lub chemiczną substancję odniesienia (zob. również pkt 23–25). W celu uzyskania równomiernego rozprowadzenia roztworów, zawiesin lub emulsji badanej substancji chemicznej lub substancji chemicznej odniesienia należy rozprowadzić ją równomiernie na powierzchni kolumn glebowych. Jeżeli w przypadku badanej substancji chemicznej zaleca się połączenie jej z glebą, należy wymieszać ją z niewielką ilością (np. 20 g) gleby i umieścić na powierzchni kolumny glebowej.

37. Powierzchnię kolumn glebowych przykrywa się następnie krążkiem ze spiekanego szkła, kulkami szklanymi, filtrami z włókna szklanego lub krążkami bibuły filtracyjnej w celu równomiernego rozmieszczenia sztucznego deszczu na całej powierzchni oraz uniknięcia naruszenia powierzchni gleby przez krople deszczu. Im większa średnica kolumny, tym większą ostrożność należy zachować przy nawadnianiu sztucznym deszczem kolumn glebowych, aby zapewnić równomierne rozprowadzenie sztucznego deszczu na powierzchni gleby. Następnie nawadnia się kolumny glebowe sztucznym deszczem metodą kroplową za pomocą tłoka, pompy perystaltycznej lub wkraplacza. Zaleca się zbieranie odcieków we frakcjach oraz zapisywanie ich poszczególnych objętości ([2]).

38. Po wymyciu i odsączeniu kolumn, kolumny glebowe dzieli się na odpowiednią liczbę segmentów, w zależności od informacji, które chce się uzyskać z badania; segmenty poddaje się ekstrakcji za pomocą odpowiednich rozpuszczalników lub mieszanin rozpuszczalników i analizuje pod kątem obecności badanej substancji chemicznej oraz, w stosownych przypadkach, pod kątem produktów przemiany, całkowitej promieniotwórczości i substancji chemicznej odniesienia. Odcieki i frakcje odcieków analizuje się bezpośrednio lub po ekstrakcji tych samych produktów. W przypadku zastosowania oznakowanych izotopowo badanych substancji chemicznych należy określić wszystkie frakcje zawierające ≥ 10 % zastosowanej promieniotwórczości.

Wymywanie w przypadku zalegających pozostałości

39. Świeża gleba (nie wysuszona wcześniej na powietrzu) poddawana jest działaniu badanej substancji chemicznej oznakowanej izotopowo w dawce odpowiadającej powierzchni kolumn glebowych (zob. pkt 24) i poddawana inkubacji w warunkach tlenowych zgodnie z metoda badawczą C.23 (13). Okres inkubacji (starzenia) powinien być wystarczająco długi, aby umożliwić

([1]) Przykłady gęstości objętościowej gleb o naruszonej strukturze są następujące:dla gleby piaszczystej 1,66 g · ml^{-1}
dla gleby piaszczysto-gliniastej 1,58 g · ml^{-1}
dla gleby gliniastej 1,17 g · ml^{-1}
dla gleby ilastej 1,11 · g ml^{-1}

([2]) Typowe objętości odcieków mieszczą się w zakresie 230–260 ml, co odpowiada około 92–104 % łącznego zastosowanego nawadniania sztucznym deszczem (251 ml) w przypadku kolumn glebowych o średnicy 4 cm i długości 30 cm.

▼M6

wytworzenie znacznych ilości produktów przemiany; zaleca się zastosowanie okresu starzenia odpowiadającego czasowi połowicznego rozpadu badanej substancji chemicznej ([1]), nie powinien on jednak przekraczać 120 dni. Przed wymywaniem należy przeanalizować postarzoną glebę pod kątem badanej substancji chemicznej i produktów jej przemiany.

40. Kolumny do wymywania wypełnia się do wysokości 28 cm tą samą glebą (ale suszoną na powietrzu), którą wykorzystano w doświadczeniu starzenia opisanym w pkt 34, a także oznacza się również całkowitą masę wypełnionych kolumn glebowych. Kolumny glebowe nawilża się wstępnie jak opisano w pkt 35.

41. Następnie badaną substancję chemiczną i produkty jej przemiany wprowadza się na powierzchnię kolumn glebowych w formie zalegających pozostałości glebowych (zob. pkt 39) jako segment gleby o grubości 2 cm. Całkowita wysokość kolumn glebowych (gleba nie poddana działaniu substancji chemicznej + postarzona gleba) nie powinna przekraczać 30 cm (zob. pkt 34).

42. Wymywanie przeprowadza się w sposób opisany w pkt 37.

43. Po wymyciu segmenty gleby i odcieki analizuje się, jak opisano w pkt 38, pod kątem badanej substancji chemicznej, produktów jej przemiany i nieekstrahowanej promieniotwórczości. W celu określenia, ile zalegających pozostałości zatrzymanych zostało w 2 cm górnej warstwie po wymyciu, należy ten segment przeanalizować odrębnie.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

44. Ilości badanej substancji chemicznej, produktów przemiany, nieekstrahowalnych pozostałości oraz, jeżeli wykorzystana została w badaniu, chemicznej substancji odniesienia należy podać w % zastosowanej początkowej dawki w odniesieniu do każdego segmentu gleby i frakcji odcieku. W odniesieniu do każdej kolumny należy przedstawić wykres z naniesionymi uzyskanymi wartościami procentowymi w funkcji głębokości warstwy gleby.

45. Jeżeli w badaniach wymywania w kolumnie zastosowana została chemiczna substancja odniesienia, wymywanie substancji chemicznej może zostać ocenione we względnej skali z wykorzystaniem czynników względnej mobilności (RMF; zob. definicja w dodatku 3) (1)(11), co umożliwia porównanie danych dotyczących wymywania różnych substancji chemicznych uzyskanych w odniesieniu do różnych rodzajów gleby. Przykłady wartości czynników względnej mobilności w odniesieniu do różnych chemicznych środków ochrony roślin podane zostały w dodatku 3.

46. Szacunkowe wartości K_{oc} (współczynnika adsorpcji znormalizowanego zawartością węgla organicznego) i K_{om} (współczynnika rozkładu znormalizowanego substancją organiczną) można również uzyskać na podstawie wyników wymywania w kolumnie, wykorzystując średnią drogę wymywania lub ustalone korelacje między czynnikiem względnej mobilności RMF oraz odpowiednio K_{om} i K_{oc} (4), lub stosując teorię chromatografii (24). Jednak należy zachować ostrożność, stosując tę drugą metodę, biorąc zwłaszcza pod uwagę fakt, że proces wymywania nie obejmuje samych tylko warunków nasyconego przepływu, a raczej układy nienasycone.

([1]) W glebie może powstać więcej niż jeden główny produkt przemiany, który może również występować w różnych momentach w trakcie badania przemiany. W takich przypadkach konieczne może być przeprowadzenie badań wymywania z zastosowaniem zalegających pozostałości powstałych w różnym czasie.

▼M6

Interpretacja wyników

47. Opisane w niniejszej metodzie badania wymywania w kolumnie umożliwiają określenie potencjału wymywania lub mobilności badanej substancji chemicznej w glebie (w badaniu wymywania substancji macierzystej) lub produktów jej przemiany (w badaniu wymywania zalegających pozostałości). Badania te nie pozwalają przewidzieć pod względem ilościowym działania wymywającego w warunkach terenowych, ale mogą zostać wykorzystane dla porównania „zdolności do wymywania" jednej substancji chemicznej z innymi substancjami chemicznymi o znanym działaniu wymywającym (24). Podobnie nie pozwalają określić ilościowo procentowej części zastosowanej substancji chemicznej, która może dotrzeć do wody gruntowej (11). Wyniki badań wymywania w kolumnie mogą jednak pomóc w podjęciu decyzji, czy należy wykonać dodatkowe badanie w warunkach terenowych lub zbliżonych do terenowych w odniesieniu do substancji chemicznych wykazujących wysoki potencjał mobilności w badaniach laboratoryjnych.

Sprawozdanie z badania

48. Sprawozdanie musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna oraz chemiczna substancja odniesienia (jeżeli została wykorzystana)

— nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna (nomenklatura IUPAC i CAS), numer CAS, struktura chemiczna (wskazanie pozycji znacznika w przypadku zastosowania materiału znakowanego izotopowo) oraz istotne właściwości fizykochemiczne;

— czystość (zanieczyszczenia) badanej substancji chemicznej;

— radiochemiczna czystość oznakowanej substancji chemicznej oraz aktywność właściwa (w razie potrzeby).

Badane gleby:

— szczegółowe informacje dotyczące miejsca pobrania;

— właściwości gleb, takie jak pH, zawartość węgla organicznego i gliny, tekstura oraz gęstość objętościowa (w przypadku gleby o naruszonej strukturze);

— aktywność mikroorganizmów w glebie (tylko w przypadku gleby wykorzystywanej do starzenia badanej substancji chemicznej);

— czas i warunki przechowywania gleby.

Warunki badania:

— daty wykonywania badań;

— długość i średnica kolumn do wymywania;

— całkowita masa gleby w kolumnach glebowych;

— ilość wprowadzanej badanej substancji chemicznej oraz, w stosownych przypadkach, chemicznej substancji odniesienia;

— ilość, częstotliwość i czas zastosowania sztucznego deszczu;

— temperatura prowadzenia eksperymentu;

— liczba powtórzeń (co najmniej dwa);

— metody analizy badanej substancji chemicznej, produktów przemiany oraz, w stosownych przypadkach, chemicznej substancji odniesienia w różnych segmentach gleby i odciekach;

— metody charakteryzowania i identyfikacji produktów przemiany w segmentach gleb i odciekach.

▼**M6**

Wyniki badania:

— tabele wyników wyrażonych jako stężenia oraz jako % zastosowanej dawki w odniesieniu do segmentów gleby i odcieków;

— bilans masy, w stosownych przypadkach;

— objętości odcieku;

— długość dróg wymywania oraz, w stosownych przypadkach, czynniki względnej mobilności;

— graficzny wykres zawartości % w segmentach gleby w funkcji głębokości segmentu gleby;

— omówienie i interpretacja wyników.

BIBLIOGRAFIA

(1) Guth, J.A., Burkhard, N. i 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 (w przygotowaniu). W: Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T.R. Roberts i P.C. Kearney, red.). J. Wiley & Sons.

(3) 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, 1050-1059.

(4) Chiou, C.T., Porter, P.E. i 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) Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (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) Załącznik I do dyrektywy Komisji 95/36/WE z dnia 14 lipca 1995 r. zmieniającej dyrektywę Rady 91/414/EWG dotyczącą wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin (Tekst mający znaczenie dla EOG), Dz.U. L 172 z 22.7.1995, s. 8.

(9) Niderlandzka Komisja ds. Rejestracji Pestycydów (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). Procedury oceny losów w środowisku i ekotoksyczności pestycydów. Mark R. Lynch, red.

(12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Włochy, 18–20 styczeń 1995 r.

(13) Następujące rozdziały niniejszego załącznika:

Rozdział A.4, Prężność par

Rozdział A.6, Rozpuszczalność w wodzie

▼**M6**

Rozdział A.8, Współczynnik podziału, metoda wytrząsania w kolbie

Rozdział A.24, Współczynnik podziału, wysokosprawna chromatografia cieczowa

Rozdział C.7, Degradacja — degradacja abiotyczna: hydroliza jako funkcja pH

Rozdział C.18, Adsorpcja/desorpcja z wykorzystaniem metody równowagi partii

Rozdział C.23, Tlenowa i beztlenowa przemiana w glebie

(14) Soil Texture Classification (systemy US i FAO). Weed Science, 33, suplement 1 (1985) oraz Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Część 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, red.). Agronomy Series Nr 9, wydanie 2.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller i D.R. Kelney (red.). Seria dotycząca agronomii, nr 9, wydanie 2.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. Wydanie 1.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt nad Menem.

(19) Scheffer, F. i P. Schachtschabel (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. i T.F. Peeper (1977). (1977). Research Methods in Weed Science, wydanie 2. (B. Truelove, red.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. i Sartori, J.L. (1986). W: Research Methods in Weed Science, wydanie 3. (N.D. Camper, red.). 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. W: Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, red.), 115-133. Plenum Press, Nowy York.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. Wytyczne OECD dotyczące badania substancji chemicznych, nr 4112, OECD, Paryż.

▼M6

Dodatek 1

Definicje i jednostki

Zalegające pozostałości w glebie: badana substancja chemiczna i produkty przemiany obecne w glebie po zastosowaniu i po wystarczająco długim okresie umożliwiającym transport, adsorpcję, metabolizm i procesy rozproszenia, aby nastąpiła zmiana rozmieszczenia i chemicznego charakteru części zastosowanej substancji chemicznej (1).

Sztuczny deszcz: 0,01 M roztworu $CaCl_2$ w destylowanej lub dejonizowanej wodzie.

Średnia droga wymywania: dolna część sekcji gleby, w której łączna ilość odzyskanej substancji chemicznej = 50 % odzyskanej badanej substancji chemicznej ogółem [zwykły eksperyment wymywania] lub (dolna część sekcji gleby, w której łączna ilość odzyskanej substancji chemicznej = 50 % odzyskanej substancji chemicznej ogółem) – ((grubość warstwy zalegających pozostałości)/2) [badanie wymywania zalegających pozostałości]

Substancja chemiczna: oznacza substancję lub mieszaninę.

Odciek: faza wodna przesączona przez profil glebowy lub kolumnę glebową (1).

Wymywanie: proces w wyniku którego substancja chemiczna przemieszcza się w dół profilu glebowego lub kolumny glebowej (1).

Droga wymywania: najgłębiej położony segment gleby, w którym po procesie wymywania wykryto ≥ 0,5 % zastosowanej badanej substancji chemicznej lub zalegających pozostałości (ekwiwalent głębokości przenikania).

Granica wykrywalności i **granica oznaczalności**: granica wykrywalności jest to stężenie substancji chemicznej, poniżej którego nie można odróżnić substancji chemicznej od artefaktów analitycznych. Granica oznaczalności jest to stężenie substancji chemicznej, poniżej którego nie można oznaczyć stężenia z zadowalającą dokładnością.

Czynnik względnej mobilności: (droga wymywania badanej substancji chemicznej (cm)) / (droga wymywania chemicznej substancji odniesienia (cm))

Badana substancja chemiczna: oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej

Produkt przemiany: wszystkie substancje chemiczne powstałe w wyniku biotycznych lub abiotycznych reakcji przemiany badanej substancji chemicznej, w tym CO_2 i produkty związane w pozostałościach.

Gleba: jest mieszaniną mineralnych i organicznych składników chemicznych, przy czym te ostatnie zawierają związki o wysokiej zawartości węgla i azotu oraz o dużych masach cząsteczkowych, zamieszkana przez drobne (najczęściej mikro-) organizmy. Gleba może być wykorzystana w dwóch stanach:

— niezakłóconym, w jakim powstawała z upływem czasu, z charakterystycznymi warstwami różnych rodzajów gleb;

— zakłóconym, jak to ma na ogół miejsce na polach uprawnych lub kiedy próbki są pobierane przez kopanie i stosowane w tej metodzie badawczej (2).

(1) Holland P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

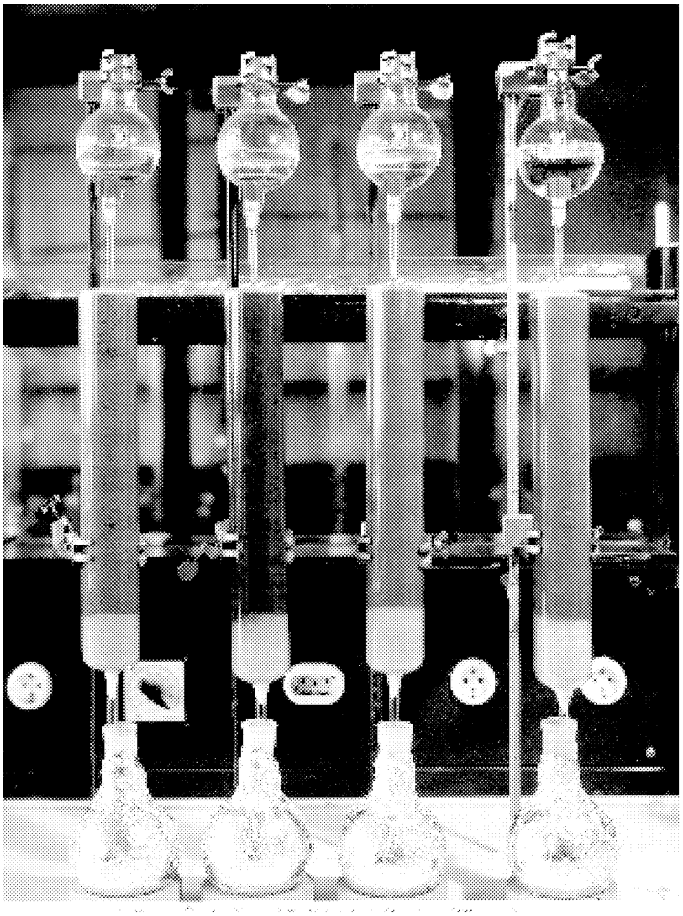
(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (przyjęta 12 maja 1981 r.).

▼M6

Dodatek 2

Rysunek 1

Przykład niepodzielnych kolumn do wymywania wykonanych ze szkła o długości 35 cm i wewnętrznej średnicy 5 cm (1)



←Ampolas gotejantes para aplicação de chuva artificial

← Disco de vidro sinterizado para evitar perturbações da superfície do solo e distribuir uniformemente a chuva artificial

← Coluna de vidro cheia do solo ensaiado (quando se ensaiam produtos fotolábeis, é necessário proteger as colunas com folha de alumínio)

← Camada de areia quartzítica

← Tampão de fibra de vidro para retenção do solo na coluna

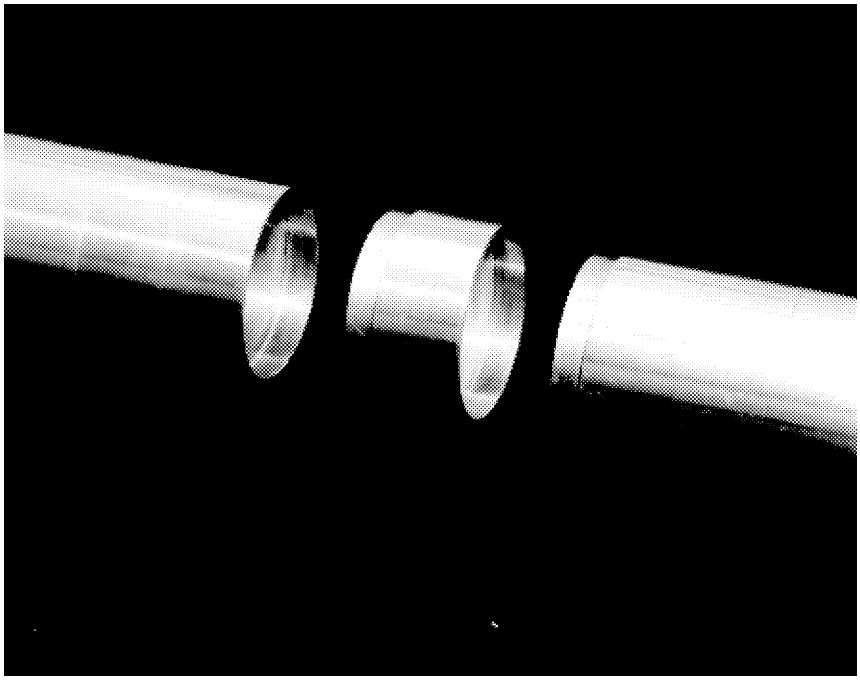
← Balão de fundo redondo para recolha do lixiviado, envolvido em folha de alumínio para impedir a fotólise

(1) Drescher N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. W: Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225–236. Verlag Wissenschaft und Politik, Kolonia.

▼**M6**

Rysunek 2

Przykład podzielnej kolumny z metalu o wewnętrznej średnicy 4 cm (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D.O. i Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

▼M6

Dodatek 3

Przykłady wartości czynników względnej mobilności (RMF) (*) chemicznych środków ochrony roślin (1)(2) i odpowiednie klasy mobilności (+)

Zakres RMF	Substancja chemiczna (RMF)	Klasa mobilności
≤ 0,15	Paration (< 0,15), Flurodifen (0,15)	I niemobilna
0,1 – 50,8	Profenofos (0,18), Propikonazol (0,23), Diazynon (0,28), Diuron (0,38), Terbutylazyna (0,52), Metydation (0,56), Prometryn (0,59), Propazyna (0,64) Alachlor (0,66), Metolachlor (0,68)	II słabo mobilna
0,8 – 1,3	Monuron (**) (1,00), Atrazyna (1,03), Symazyna (1,04), Fluometuron (1,18)	III umiarkowanie mobilna
1,3 – 2,5	Prometon (1,67), Cyjanazyna (1,85), Bromacil (1,91) Karbutilat (1,98)	IV dość mobilna
2,5 – 5,0	Karbofuran (3,00), Dioksakarb (4,33)	V mobilna
> 5,0	Monokrotofos (> 5,0), Dikrotofos (> 5,0)	VI bardzo mobilna

(*) Czynnik względnej mobilności wyprowadza się w następujący sposób (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{droga wymywania badanej substancji chemicznej (cm)}}{\text{droga wymywania chemicznej substancji odniesienia (cm)}}$$

(**) Chemiczna substancja odniesienia

\+ Podstawą innych systemów klasyfikacji mobilności substancji chemicznej w glebie są wartości R_f z chromatografii cienkowarstwowej gleby \big(4) i wartości K_{oc} (5)(6).

(1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. Na wspólnym międzynarodowym sympozjum pt. „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment". Canterbury, Zjednoczone Królestwo, 1–3 lipca 1985 r.

(2) Guth, J.A. i 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. i Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. W: Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Materiały z sympozjum AOAC, AOAC, Waszyngton 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. **OSZACOWANIE EMISJI DO ŚRODOWISKA Z DREWNA PODDANEGO DZIAŁANIU ŚRODKÓW KONSERWUJĄCYCH: METODA LABORATORYJNA STOSOWANA W ODNIESIENIU DO PRODUKTÓW Z DREWNA. KTÓRE NIE SĄ POKRYTE I MAJĄ STYCZNOŚĆ Z WODĄ SŁODKĄ LUB WODĄ MORSKĄ**

WPROWADZENIE

1. Opisywana metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 313 (2007 r.) w sprawie badań. Emisje do środowiska z drewna poddanego działaniu środka konserwującego należy określać ilościowo, aby umożliwić ocenę ryzyka środowiskowego, jakie stwarza zakonserwowane drewno. W niniejszej metodzie badawczej opisano laboratoryjną metodę szacowania emisji z drewna poddanego działaniu środka konserwującego w dwóch sytuacjach, w których zanieczyszczenia mogą przeniknąć do środowiska:

   — emisje z zakonserwowanego drewna, mającego styczność z wodą słodką. Emisje z powierzchni zakonserwowanego drewna mogą przedostać się do wody.

   — emisje z zakonserwowanego drewna, mającego styczność z wodą morską. Emisje z powierzchni zakonserwowanego drewna mogą przedostać się do wody morskiej.

2. Niniejsza metoda badawcza ma na celu zbadanie emisji z drewna i produktów z drewna, które nie są pokryte i mają styczność z wodą słodką lub morską. Klasy użytkowania stosowane są w skali międzynarodowej i służą do klasyfikacji zagrożeń biologicznych, na które narażony będzie towar poddany działaniu substancji. Klasy użytkowania definiują także sytuacje, w których zakonserwowany produkt jest użytkowany, oraz określają elementy środowiska (powietrze, woda, gleba), dla których drewno poddane działaniu środka konserwującego stanowi potencjalne ryzyko.

3. Metoda badawcza stanowi laboratoryjną procedurę pozyskiwania próbek (substancji emitowanych) z wody, w której zanurzone zostało drewno poddane działaniu substancji, w rosnących odstępach czasowych po narażeniu. Ilość emisji w substancji emitowanej powiązana jest z wielkością powierzchni drewna i długością narażenia w celu oszacowania przepływu w mg/m^2/dzień. Przepływ (tempo wymywania) można zatem oszacować na podstawie rosnących okresów narażenia.

4. Ilość emisji może zostać wykorzystana do oceny ryzyka środowiskowego drewna poddanego działaniu substancji.

WSTĘPNE ROZWAŻANIA

5. Nie zakłada się identycznego charakteru i intensywności mechanizmu wymywania z powierzchni drewna przez wodę słodką i przez wodę morską. Zatem w przypadku wyrobów konserwujących do drewna lub ich mieszanin wykorzystywanych do zabezpieczania drewna wykorzystywanego w środowisku morskim konieczne jest przeprowadzenie badania wymywania w wodzie morskiej.

6. W przypadku drewna zakonserwowanego środkiem konserwującego należy wykorzystywać drewno reprezentatywne dla drewna znajdującego się w handlu. Drewno powinno być zakonserwowane zgodnie z instrukcją producenta środka konserwującego oraz zgodnie z odpowiednimi standardami i specyfikacjami. Przed rozpoczęciem badania ustalić należy parametry kondycjonowania drewna po konserwacji.

7. Próbki drewna powinny być reprezentatywne dla użytkowanych wyrobów (np. w odniesieniu do gatunku, gęstości i innych cech charakterystycznych).

▼M6

8. Badanie można zastosować do drewna, stosując proces nasycania albo nakładania powierzchniowego, albo do drewna impregnowanego, którego powierzchnia została dodatkowo obowiązkowo zabezpieczona (np. farbą, którą stosuje się obowiązkowo w celach handlowych).

9. Skład, ilość, pH i fizyczna forma wody są istotne przy oznaczaniu ilości, zawartości i charakteru emisji z drewna.

ZASADA METODY BADANIA

10. Próbki drewna impregnowanego środkiem konserwującym przeznaczone do badań zanurzane są w wodzie. Wodę (próbkę substancji emitowanej) pobiera się i wielokrotnie analizuje pod względem chemicznym przez okres narażenia wystarczająco długi, aby wykonać obliczenia statystyczne. Poziomy emisji w mg/m^2/dzień oblicza się na podstawie wyników badań. Należy odnotowywać okresy pobierania próbek. Badania z próbkami nie poddanymi działaniu środka można przerwać, jeżeli w trzech pierwszych punktach danych nie wykryto żadnego tła.

11. Włączenie do badania próbek drewna niezakonserwowanego umożliwia określenie poziomów tła w przypadku emisji z drewna innej niż wynikająca z zastosowanego środka konserwującego.

KRYTERIA JAKOŚCI

Dokładność

12. Dokładność metody badawczej służącej do oszacowania emisji zależy od reprezentatywności próbek do badań w odniesieniu do drewna impregnowanego obecnego w handlu, reprezentatywności wody w odniesieniu do wody w warunkach rzeczywistych oraz reprezentatywności systemu narażenia w stosunku do warunków naturalnych.

13. Dokładność, precyzję i powtarzalność metody analitycznej należy określić przed wykonaniem badania.

Odtwarzalność

14. Pobiera się i analizuje trzy próbki wody, a średnią wartość przyjmuje się jako wartość emisji. Odtwarzalność wyników w przypadku jednego laboratorium i w różnych laboratoriach zależy od schematu zanurzania oraz drewna wykorzystanego jako próbki do badań.

Akceptowalny zakres wyników

15. Za akceptowalny uznaje się taki zakres wyników badania, w przypadku którego różnica pomiędzy górną a dolną wartością wynosi mniej niż jeden rząd wielkości.

WARUNKI BADANIA

Woda

16. Scenariusz wymywania w wodzie słodkiej: w badaniach wymywania, w których przeprowadza się ocenę drewna narażonego na kontakt z wodą słodką, zaleca się stosowanie wody dejonizowanej (np. ASTM D 1193 Type II). Temperatura wody powinna wynosić 20 +/– 2 °C, a zmierzone pH i temperaturę wody należy podać w sprawozdaniu z badania. Analiza próbek użytej wody pobranych przed zanurzeniem badanych próbek drewna umożliwia oszacowanie zawartości analizowanej substancji chemicznej w wodzie. Stanowi ona próbę kontrolną do oznaczenia poziomów tła substancji chemicznych, które są następnie analizowane pod względem chemicznym.

▼M6

17. Scenariusz wymywania z wodą morską: w badaniach wymywania, w których przeprowadza się ocenę drewna narażonego na kontakt z wodą morską, zaleca się zastosowanie syntetycznej wody morskiej (np. ASTM D 1141 Substitute Ocean Water, without Heavy Metals). Temperatura wody powinna wynosić 20 +/-2 °C, a zmierzone pH i temperaturę wody należy podać w sprawozdaniu z badania. Analiza próbek użytej wody pobranych przed zanurzeniem badanych próbek drewna umożliwia oszacowanie zawartości analizowanej substancji chemicznej w wodzie. Stanowi ona próbę kontrolną do oznaczania poziomów tła istotnych substancji chemicznych.

Próbki drewna użytego do badań

18. Gatunki drewna powinny być typowe dla gatunków drewna wykorzystywanych w badaniach skuteczności środków konserwujących do drewna. Do zalecanych gatunków zaliczają się *Pinus sylvestris* L. (sosna zwyczajna), *Pinus resinosa Ait*. (sosna czerwona) lub *Pinus spp* (sosna południowa). Można wykonać dodatkowe badania, wykorzystując inne gatunki.

19. Wykorzystać należy drewno o prostych włóknach bez sęków. Należy unikać stosowania materiału z widocznymi wyciekami żywicy. Drewno powinno być typowe dla drewna dostępnego w handlu. Należy zanotować źródło pochodzenia, gęstość i liczbę rocznych pierścieni przypadających na 10 mm.

20. Zaleca się, aby próbki drewna użyte do badań stanowiły zestawy pięciu bloków o wymiarach zgodnych z normą PN-EN 113:2000 (25 mm × 50 mm × 15 mm) z powierzchniami wzdłużnymi równoległymi do słojów drewna, chociaż można również stosować inne wymiary, np. 50 mm na 150 mm na 10 mm. Próbkę drewna użytą do badań należy całkowicie zanurzyć w wodzie. Próbki drewna użyte do badań powinny składać się w 100 % z bieli. Każdą próbkę drewna można oznakować w wyjątkowy sposób, tak aby można było ją identyfikować w trakcie badania.

21. Wszystkie próbki drewna użyte do badań powinny być oheblowane lub tarte, a ich powierzchnia nie powinna być oszlifowana.

22. W analizie wykorzystać należy co najmniej pięć zestawów próbek drewna użytych do badania: trzy zestawy próbek drewna należy poddać działaniu środka konserwującego, jednego zestawu próbek drewna nie należy poddawać działaniu tego środka, a jeden należy wykorzystać w celu oszacowania zawartości wilgoci próbek drewna użytych do badania po wysuszeniu w piecu przed ich impregnacją środkiem. Przygotowuje się wystarczającą liczbę próbek drewna do badań, aby umożliwić wybór trzech zestawów mieszczących się w zakresie 5 % średniej wartości retencji środka konserwującego grupy próbek do badań.

23. Wszystkie próbki drewna do badań zostają uszczelnione na końcach substancją chemiczną zapobiegającą przeniknięciu środka konserwującego do końcowego słoja próbki lub zapobiegającą wymywaniu środka z próbki przez końcowy słój. Konieczne jest odróżnianie próbek drewna użytych do powierzchniowego stosowania i do nasycania w odniesieniu do stosowania środka uszczelniającego końce próbki. Środek uszczelniający końce próbek drewna należy stosować przed rozpoczęciem zabiegu jedynie w przypadku powierzchniowego zastosowania środka konserwującego.

24. Usłojenie końcowej części musi pozostać dostępne do zabiegu nasycania. W związku z tym próbki drewna należy uszczelnić na końcach po zakończeniu okresu kondycjonowania. Emisję należy oszacować tylko w odniesieniu do wzdłużnej powierzchni. Substancje uszczelniające należy sprawdzić i w razie potrzeby ponownie zastosować przed rozpoczęciem wymywania; nie należy ich ponownie stosować po rozpoczęciu wymywania.

▼M6

Pojemnik do zanurzania próbek

25. Pojemnik wykonany jest z obojętnego materiału i jest wystarczająco duży, aby pomieścić 5 próbek drewna, spełniających wymagania normy PN-EN 113:2000 w 500 ml wody, dając w rezultacie stosunek obszaru powierzchni do objętości wody 0,4 cm^2/ml.

Konstrukcja do ułożenia próbek drewna

26. Próbki drewna do badań są umieszczane na konstrukcji umożliwiającej kontakt z wodą wszystkich odsłoniętych powierzchni próbki.

PROCEDURA KONSERWACJI ŚRODKAMI KONSERWUJĄCYMI

Przygotowanie zakonserwowanych próbek do badań

27. Próbkę drewna do badań, którą w ramach badania należy zakonserwować środkiem konserwującym, poddaje się procesowi konserwacji metodą określoną dla danego środka konserwującego, którą może być nasycanie lub nakładanie powierzchniowe przez zanurzanie, za pomocą urządzenia rozpylającego lub pędzla.

Środki konserwujące, które należy zastosować w przypadku konserwacji przez nasycanie

28. Należy przygotować roztwór środka konserwującego, który zapewni określoną absorpcję lub retencję, jeżeli zostanie zastosowany w procedurze konserwacji przez nasycanie. Próbka drewna do badań zostaje zważona i zmierzona. Proces konserwacji przez nasycanie powinien być zgodny z procesem określonym dla środków konserwujących do drewna przeznaczonych do użytku w klasie użytkowania 4 lub 5. Próbkę drewna ponownie waży się po jej zakonserwowaniu, a retencję środka konserwującego (kg/m^3) oblicza się według równania:

$$\frac{\text{Masa po obróbce(kg)} - \text{Masa przed obróbką(kg)}}{\text{Objętość próbki do badań}(m^3)} \times \frac{\text{Roztwór Stężenie(\% masa/masa)}}{100}$$

29. Należy zauważyć, że w badaniu można wykorzystać drewno konserwowane w zakładzie konserwacji drewna (np. przy zastosowaniu impregnacji próżniowo – ciśnieniowej). Należy zanotować wykorzystane procedury, a retencję materiału zakonserwowanego w taki sposób należy przeanalizować i zapisać.

Środki konserwujące, które należy stosować w przypadku procesu stosowania powierzchniowego

30. Proces stosowania powierzchniowego obejmuje zanurzanie, natryskiwanie lub malowanie pędzlem próbek drewna. Proces i ilość środka (np. litry/m^2) powinny być zgodne z wymogami dotyczącymi powierzchniowego stosowania środka konserwującego.

31. Należy również zauważyć, że w badaniu tym wykorzystać można drewno konserwowane w zakładzie konserwacji drewna. Należy zanotować wykorzystane procedury, a retencję materiału zakonserwowanego w taki sposób należy przeanalizować i zapisać.

Kondycjonowanie próbek do badań po konserwacji

32. Po zakonserwowaniu próbki do badań należy kondycjonować zgodnie z zaleceniami dostawcy badanego środka konserwującego, zgodnie z wymogami określonymi na etykiecie środka konserwującego lub zgodnie ze stosowanymi w handlu praktykami konserwacyjnymi, lub zgodnie z normą PN-EN 252:1994.

▼M6

Przygotowanie i wybór próbek drewna do badań

33. Po kondycjonowaniu następującym po konserwacji oblicza się średnią retencję grupy próbek do badań, a trzy reprezentatywne zestawy próbek o retencji mieszczącej się w zakresie 5 % średniej grupy wybiera się losowo do pomiarów wymywania.

PROCEDURA POMIARÓW EMISJI ŚRODKÓW KONSERWUJĄCYCH

Metoda zanurzenia

34. Próbki drewna do badań waży się, a następnie całkowicie zanurza w wodzie, rejestrując datę i czas. Pojemnik przykrywa się, aby zmniejszyć parowanie.

35. Wodę wymienia się w następujących odstępach: 6 godzin, 1 dzień, 2 dni, 4 dni, 8 dni, 15 dni, 22 dni, 29 dni (uwaga: są to łączne okresy czasu, a nie odstępy czasu). Należy zarejestrować datę i czas wymiany wody oraz masę wody odzyskanej z pojemnika.

36. Po każdej wymianie wody próbkę wody, w której zanurzony został zestaw próbek do badań, zachowuje się w celu późniejszej analizy chemicznej.

37. Procedura pobierania próbek umożliwia obliczenie profilu ilości emisji w stosunku do czasu. Próbki należy przechowywać w warunkach chroniących analit, np. w chłodziarce bez dostępu światła w celu ograniczenia rozwoju mikroorganizmów w próbce przed analizą.

POMIARY EMISJI

Próbki zakonserwowane

38. W stosownych przypadkach pobraną wodę analizuje się pod względem chemicznym pod kątem substancji czynnych lub odnośnych produktów degradacji/przemiany.

Próbki niekonserwowane

39. Pobieranie wody (próbek substancji emitowanej) w tym układzie i późniejsza analiza substancji chemicznych, które zostały wymyte z próbek drewna niekonserwowanego, umożliwiają oszacowanie ewentualnego poziomu emisji środka konserwującego z drewna niekonserwowanego. Pobranie i analiza próbek substancji emitowanej po rosnących okresach narażenia umożliwia oszacowanie dynamiki zmian poziomu emisji w czasie. Analiza ta stanowi procedurę kontrolną, mającą na celu określenie poziomów tła badanej substancji chemicznej w drewnie niekonserwowanym w celu potwierdzenia, że drewno użyte jako źródło próbek nie zostało wcześniej poddane działaniu środka konserwującego.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Analizy chemiczne

40. Pobraną wodę analizuje się pod względem chemicznym, a wynik analizy wyraża się w odpowiednich jednostkach, np. w µg/l.

Przekazywanie danych

41. Wszystkie wyniki są rejestrowane. W dodatku przedstawiony został przykład formy zapisu dla jednego zestawu próbek do badań i tabela zestawieniowa do obliczania średnich wartości emisji dla każdego przedziału czasowego pobierania próbek.

42. Dobowy strumień emisji w mg/m^2/dobę oblicza się, przyjmując średnią z trzech pomiarów trzech kontrprób i dzieląc ją przez liczbę dni zanurzenia.

▼M6

Sprawozdanie z badania

43. Sprawozdanie z badania powinno zawierać co najmniej następujące informacje:

— nazwa dostawcy badanego środka do konserwacji;

— szczególna i niepowtarzalna nazwa lub niepowtarzalny kod badanego środka do konserwacji;

— nazwa handlowa lub nazwa zwyczajowa substancji czynnych z ogólnym opisem składników obojętnych (np. rozpuszczalnika obojętnego, żywicy) oraz zawartość składników wyrażona w % m/m;

— właściwa retencja lub obciążenie (odpowiednio w kg/m^3 lub l/m^2) określone w przypadku drewna zastosowanego w kontakcie z wodą;

— użyte gatunki drewna, gęstość i tempo wzrostu w pierścieniach na 10 mm;

— obciążenie lub retencja badanego środka konserwującego i wzór zastosowany do obliczenia retencji wyrażonej w l/m^2 lub kg/m^3;

— metoda zastosowania środka konserwującego, określająca zastosowany harmonogram narażania na działanie substancji w przypadku nasączania i metodę nakładania w przypadku konserwacji powierzchniowej;

— data zastosowania środka konserwującego i oszacowanie zawartości wilgoci w próbkach do badań wyrażonej w procentach;

— zastosowane procedury kondycjonowania z określeniem rodzaju, warunków i czasu trwania;

— specyfikacja zastosowanego końcowego uszczelniacza i liczba zastosowań;

— specyfikacja każdego późniejszego procesu konserwacji drewna, np. specyfikacja dostawcy, rodzaju, cech charakterystycznych i ilości farby;

— czas i data każdego zanurzenia, ilość wody zastosowana do zanurzenia próbek do badań przy każdym zanurzeniu i ilość wody wchłoniętej przez drewno podczas zanurzenia;

— wszelkie zmiany w stosunku do opisanej metody i wszelkie czynniki, które mogły wpływać na wyniki.

BIBLIOGRAFIA

(1) Norma europejska EN 84–1997. Środki do konserwacji drewna Przyspieszone starzenie drewna poddanego działaniu substancji przed testami biologicznymi. Procedura wymywania.

(2) Norma europejska EN 113/A1–2004. Środki do konserwacji drewna Metoda badawcza mająca na celu określenie efektywności ochrony przeciwko grzybom podstawkowym niszczącym drewno. Określenie toksycznych wartości.

(3) Norma europejska EN 252–1989. Metoda badań eksploatacyjnych w celu badania względnej efektywności ochrony środka do konserwacji drewna w styczności z ziemią.

(4) Norma europejska EN 335 – Część 1: 2006. Trwałość drewna i materiałów drewnopochodnych – Klasy użytkowania: definicje – Część 1: Postanowienia ogólne.

(5) Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów, ASTM D 1141–1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, tom 11.02.

(6) Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów, ASTM D 1193-77 Type II–1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, tom 11.01.

▼**M6**

Dodatek 1

Formularz danych dla metody badawczej

Oszacowanie emisji do środowiska z drewna poddanego działaniu środków do konserwacji: metoda laboratoryjna stosowana w przypadku produktów z drewna. które nie są pokryte i mają styczność z wodą słodką lub wodą morską

Laboratorium	

Środek do konserwacji drewna

Dostawca środka do konserwacji	
Szczególna i niepowtarzalna nazwa lub niepowtarzalny kod środka do konserwacji	
Nazwa handlowa lub nazwa zwyczajowa środka do konserwacji	
Składniki obojętne	
Właściwa retencja w przypadku drewna zastosowanego w kontakcie z wodą	

Zastosowanie

Metoda zastosowania	
Data zastosowania	
Wzór zastosowany do obliczenia retencji:	
Procedura kondycjonowania	
Czas trwania kondycjonowania	
Środek uszczelniający końce próbki/liczba zastosowań	
Kolejna konserwacja	w stosownych przypadkach

Próbki do badań

Gatunki drewna	
Gęstość drewna	(min. … średnia … maks.)
Tempo wzrostu (pierścienie na 10 mm)	(min. … średnia … maks.)
Zawartość wilgoci	

▼**M6**

Konstrukcje do przeprowadzania badań (*)	**Retencja (np. kg/m^3)**
Próbka „x” zakonserwowana środkiem do konserwacji	Średnia arytmetyczna i odchylenie standardowe lub zakres dla 5 próbek
Próbka „y” zakonserwowana środkiem do konserwacji	Średnia arytmetyczna i odchylenie standardowe lub zakres dla 5 próbek
Próbka „z” zakonserwowana środkiem do konserwacji	Średnia arytmetyczna i odchylenie standardowe lub zakres dla 5 próbek
Próbki niezakonserwowane	
Zmienność parametrów metody badawczej	np. jakość wody, wymiary próbek do badań itd.

(*) x, y, z reprezentują trzy kontrpróby

▼M6

Czas	Wymiana wody	Masa próbki		Absorpcja wody		Próbka wody				
		Próbki zakonserwowane (średnia arytmetyczna)	Próbki niezakonserwowane	Próbki zakonserwowane (średnia arytmetyczna)	Próbki niezakonserwowane		Woda do badań	x	y	z
	Data	g	g	g	g	nr	pH	pH	pH	pH
rozpoczęcie										
6 h						1				
24 h						2				
2 d						3				
4 d						4				
8 d						5				
15 d						6				
22 d						7				
29 d						8				

▼M6

Należy przygotować oddzielne tabele dla każdego składnika aktywnego

Czas	Wymiana wody	Wyniki badania															
		Próbki niezakonserwowane			Próbki zakonserwowane												
		Stężenie składnika aktywnego w wodzie mg/l	Wyemitowana ilość mg/m^2	Natężenie emisji $mg/m^2/d$	Stężenie składnika aktywnego w wodzie				Wyemitowana ilość				Natężenie emisji			
					x	y	z	Średnia	x	y	z	Średnia	x	y	z	Średnia
	Data				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$
6 h																
24 h																
2 d																
4 d																
8 d																
15 d																
22 d																
29 d																

Uwaga: ponieważ może zajść konieczność wykorzystania wyników uzyskanych z próbek niezakonserwowanych do korekty natężeń emisji z próbek zakonserwowanych, wyniki z próbek niekonserwowanych powinny być podane w pierwszej kolejności, zaś wszystkie wartości dla próbek zakonserwowanych stanowiłyby „wartości skorygowane”. Możliwa jest również korekta wstępnej analizy wody.

▼**M6**

Dodatek 2

Definicje

Substancja chemiczna: oznacza substancję lub mieszaninę.

Badana substancja chemiczna: oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

▼M6

C.46. BIOAKUMULACJA U BENTOSOWYCH SKĄPOSZCZETÓW ŻYJĄCYCH W OSADZIE

WPROWADZENIE

1. Opisywana metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 315 (2008 r.) w sprawie badań dotyczącą narażenia organizmów bentosowych żyjących w osadzie na zawarte w nim substancje (1). Wśród tych organizmów czerpiących pokarm z osadu znajdują się skąposzczety wodne, które odgrywają ważną rolę na dnie systemów wodnych. Żyją one w osadzie i często stanowią najliczniejszy gatunek, w szczególności w siedliskach, w których warunki środowiskowe są niekorzystne dla innych zwierząt. Przyczyniając się do bioturbacji osadu oraz stanowiąc żer dla innych organizmów, zwierzęta te mogą mieć silny wpływ na biodostępność takich substancji dla innych organizmów, np. ryb poszukujących pokarmu w osadzie. W przeciwieństwie do organizmów żyjących na powierzchni osadu, wodne skąposzczety żyjące w osadzie zakopują się w nim i zjadają cząstki osadu znajdujące się pod jego powierzchnią. Z tego powodu, organizmy te są narażone na działanie substancji przez wiele dróg absorpcji, w tym bezpośredni kontakt, zjadanie zanieczyszczonych cząstek osadu, wodę porową i warstwę wody nadosadowej. Niektóre gatunki skąposzczetów bentosowych żyjących w osadzie, wykorzystywane obecnie w badaniach ekotoksykologicznych, opisano w dodatku 6.

2. Parametry, które charakteryzują bioakumulację substancji, obejmują współczynnik bioakumulacji (BAF), stałą szybkości absorpcji osadu (k_s) oraz stałą szybkości eliminacji (k_e). Szczegółowe definicje tych parametrów podano w dodatku 1.

3. Aby dokonać ogólnej oceny potencjału bioakumulacji substancji i zbadać bioakumulację substancji, które zwykle ulegają rozdziałowi w lub na osadach, potrzebna jest metoda badawcza specyficzna dla danego przedziału (1)(2)(3)(4).

4. Niniejsza metoda badawcza została zaprojektowana w celu oceny bioakumulacji substancji związanych z osadem u skąposzczetów żyjących w osadzie. Osad wzbogaca się badaną substancją. Stosowanie wzbogaconego osadu ma na celu symulowanie zanieczyszczonego osadu.

5. Metoda ta opiera się na istniejących metodach badania toksyczności osadu i bioakumulacji (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Inne przydatne dokumenty obejmują dyskusję wyników międzynarodowego warsztatu (11) i wynik międzynarodowego badania międzylaboratoryjnego (12).

6. Badanie to ma zastosowanie do stabilnych, neutralnych substancji organicznych, które na ogół są powiązane z osadami. Niniejsza metoda badawcza może być również stosowana do pomiaru bioakumulacji związanych z osadem, stabilnych związków metaloorganicznych (12). Nie ma ona zastosowania do metali ani innych pierwiastków śladowych (11), jeżeli projekt badania nie zostanie zmodyfikowany pod względem substratu i objętości wody, i ewentualnie wielkości próbki tkanki.

WARUNEK WSTĘPNY I INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI

7. Istnieje tylko kilka ugruntowanych ilościowych zależności struktura-aktywność (QSAR) dotyczących dostępnych obecnie procesów bioakumulacji (14). Najszerzej stosowaną zależnością jest korelacja między odpowiednio bioakumulacją i biokoncentracją stabilnych substancji organicznych oraz ich lipofilnością (wyrażona jako logarytm współczynnika podziału oktanol-woda (log K_{ow}), którego definicja znajduje się w dodatku 1), którą opracowano w celu opisania rozdziału substancji między wodę i ryby. Zależność ta została również zastosowana do ustalenia korelacji dla osadowego przedziału środowiska wodnego (15)(16)(17)(18). Korelacja log

▼M6

K_{ow}-log BCF jako istotna ilościowa zależność struktura-aktywność może być pomocna we wstępnym oszacowaniu potencjału bioakumulacji substancji związanych z osadem. Na BAF może jednak wpływać zawartość lipidów w organizmie użytym do badania i zawartość węgla organicznego w osadzie. W związku z tym współczynnik podziału węgiel organiczny-woda (K_{oc}) można również zastosować jako główną determinantę bioakumulacji substancji organicznych związanych z osadem.

8. Badanie to ma zastosowanie do:

— stabilnych substancji organicznych o wartościach log K_{ow} między 3,0 i 6,0 (5)(19) oraz substancji superlipofilowych, które wykazują log K_{ow} powyżej 6,0 (5);

— substancji, które należą do klasy substancji organicznych znanych z potencjału bioakumulacji w organizmach żywych, np. substancji powierzchniowo czynnych lub substancji o wysokiej adsorpcyjności (np. o wysokim K_{oc}).

9. Informacje na temat badanej substancji, takie jak środki ostrożności, odpowiednie warunki przechowywania i stabilność oraz metody analityczne należy uzyskać przed rozpoczęciem badania. Wskazówki dotyczące badania substancji o własnościach fizykochemicznych, które utrudniają ich badanie, podano w (20) i (21). Przed rozpoczęciem badania bioakumulacji u skąposzczetów wodnych należy uzyskać następujące informacje o substancji badanej:

— nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna (najlepiej wg nomenklatury IUPAC), wzór strukturalny, numer CAS, czystość;

— rozpuszczalność w wodzie metoda badawcza A.6 (22)];

— współczynnik podziału oktanol/woda, K_{ow} [metody badawcze A.8, A.24 (22)];

— współczynnik podziału osad-woda, wyrażony jako K_d lub K_{oc} [metoda badawcza C19 (22)];

— hydroliza [metoda badawcza C.7] (22);

— fototransformacja w wodzie (23);

— prężność par [metoda badawcza A.4 (22)];

— szybka biodegradowalność [metody badawcze C.4 i C.29 (22)];

— napięcie powierzchniowe [metoda badawcza A.5 (22)];

— krytyczne stężenie micelizacji (24).

Ponadto istotne mogą być następujące informacje, jeżeli są dostępne:

— biodegradacja w środowisku wodnym [metody badawcze C.24 i C.25 (22)];

— stała Henry'ego.

10. Oznakowane izotopowo substancje badane ułatwiają analizę wody, osadu i próbek biologicznych i mogą być wykorzystane do określenia, czy należy dokonywać identyfikacji i oznaczania ilościowego produktów degradacji. Opisana tu metoda została zweryfikowana w ramach międzynarodowego badania międzylaboratoryjnego (12) substancji znakowanych ^{14}C. Jeżeli mierzy się całkowitą ilość pozostałości radioaktywnych, współczynnik bioakumulacji (BAF) opiera się na substancji macierzystej, wraz ze wszystkimi zachowanymi produktami degradacji. Można również połączyć badanie metabolizmu z badaniem bioakumulacji, wykonując analizę i oznaczenie

▼M6

ilościowe procentowej zawartości substancji macierzystej i produktów jej degradacji w próbkach pobranych na końcu fazy absorpcji lub w szczytowym momencie bioakumulacji. W każdym razie zaleca się, aby obliczać współczynnik bioakumulacji na podstawie stężenia macierzystej substancji w organizmach, a nie tylko całkowitych pozostałości radioaktywnych.

11. Inne wymagane informacje oprócz właściwości badanej substancji to toksyczność substancji dla gatunków skąposzczetów użytych do badań, takie jak mediana stężenia śmiertelnego (LC_{50}) w odniesieniu do czasu niezbędnego dla fazy absorpcji, aby upewnić się, czy wybrane stężenia ekspozycji są znacznie poniżej poziomów toksycznych. Preferowanymi wartościami dotyczącymi toksyczności są wartości pozyskane z długoterminowych badań nad subletalnymi punktami końcowymi (EC_{50}), jeśli takie dane są dostępne. Jeśli jednak nie są dostępne, pomocnych informacji może dostarczyć badanie ostrej toksyczności w warunkach identycznych z warunkami badania bioakumulacji lub dane dotyczące toksyczności dla innych gatunków zastępczych.

12. Powinna istnieć odpowiednia metoda analityczna o znanej dokładności, precyzji oraz czułości w celu oznaczenia ilościowego substancji w roztworach do badań, w osadzie oraz w materiale biologicznym wraz ze szczegółowymi informacjami na temat przygotowania i przechowywania próbek oraz kartami charakterystyki bezpieczeństwa materiałów. Znane powinny być także analityczne granice wykrywalności badanej substancji w wodzie, osadzie i tkance organizmów. Jeśli stosuje się badaną substancję oznakowaną izotopowo, powinna być znana promieniotwórczość właściwa (np. Bq mol^{-1}), pozycja oznakowanego izotopowo atomu i odsetek promieniotwórczości związany z zanieczyszczeniami. Promieniotwórczość właściwa badanej substancji powinna być jak najwyższa, aby można było wykrywać jak najniższe badane stężenia (11).

13. Powinny być dostępne informacje na temat cech charakterystycznych zastosowanego osadu (np. pochodzenie osadu lub jego składników, pH i stężenie amoniaku w wodzie porowej (osady pobrane w terenie), zawartość węgla organicznego, rozkład wielkości cząstek (procent piasku, mułu i gliny) i procent suchej masy) (6).

ZASADA BADANIA

14. Badanie składa się z dwóch etapów: etapu absorpcji (narażenia) i etapu eliminacji (po narażeniu). Podczas etapu absorpcji organizmy zostają narażone przez kontakt z osadem, który wzbogacono badaną substancją, uzupełniono wodą regenerowaną i w razie potrzeby odstawiono do stabilizacji (11). Grupy organizmów kontrolnych przetrzymuje się w identycznych warunkach bez badanej substancji.

15. Na potrzeby etapu eliminacji organizmy przenosi się do układu osad-woda niezawierającego badanej substancji. Etap eliminacji jest niezbędny dla uzyskania informacji na temat tempa, w jakim badana substancja jest wydalana przez organizmy użyte do badań (19)(25). Etap eliminacji jest zawsze wymagany, chyba że absorpcja badanej substancji podczas etapu narażenia nie była znacząca (np. nie ma statystycznej różnicy między stężeniem badanej substancji w organizmach użytych do badania i kontrolnych). Jeśli podczas etapu absorpcji nie osiągnięto stanu ustalonego, w oparciu o wyniki uzyskane na etapie eliminacji można określić kinetykę – kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAF_k), stałą lub stałe tempa absorpcji i eliminacji. Stężenie badanej substancji w/na organizmach monitoruje się w trakcie obydwu etapów badania.

16. Podczas etapu absorpcji pomiarów dokonuje się do momentu, w którym współczynnik bioakumulacji osiągnie stan równowagi, czyli stan ustalony. Standardowo czas trwania etapu absorpcji powinien wynosić 28 dni. Doświadczenie praktyczne wykazało, że etap absorpcji trwający 12–14 dni jest wystarczający do osiągnięcia stanu ustalonego przez szereg stałych, neutralnych substancji organicznych (6)(8)(9).

▼M6

17. Jeżeli jednak stan ustalony nie zostanie osiągnięty w ciągu 28 dni, etap eliminacji zaczyna się od przeniesienia skąposzczetów narażonych na działanie substancji do naczyń zawierających to samo środowisko bez badanej substancji. Etap eliminacji kończy się albo gdy stężenie zmierzone u organizmów osiągnie 10 % poziomu stężenia zmierzonego 28. dnia etapu absorpcji, albo po upływie maksymalnego okresu 10 dni. Poziom pozostałości u organizmów pod koniec etapu eliminacji przedstawia się w sprawozdaniu jako dodatkowy punkt końcowy, np. niewyeliminowane pozostałości. Współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym (BAF_{ss}) należy obliczać jako stosunek stężenia w organizmach (C_a) i w osadzie (C_s) przy ewidentnym stanie ustalonym i jako kinetyczny współczynnik bioakumulacji BAF_K, czyli stosunek stałej tempa absorpcji z osadu(k_s) oraz stałej tempa eliminacji (k_e) przy założeniu kinetyki reakcji pierwszego rzędu. Jeżeli stan ustalony nie zostanie osiągnięty w ciągu 28 dni, należy obliczyć BAF_K na podstawie stałych tempa absorpcji i tempa eliminacji. Obliczenia zamieszczono w dodatku 2. Jeśli kinetyka reakcji pierwszego rzędu nie ma zastosowania, należy zastosować inne modele (dodatek 2 i pozycja bibliografii (25)).

18. Jeżeli stan ustalony nie zostanie osiągnięty w ciągu 28 dni, etap absorpcji można przedłużyć, poddając grupy organizmów narażonych na działanie substancji – jeżeli są dostępne – dalszym pomiarom do momentu osiągnięcia stanu ustalonego; równolegle należy jednak rozpocząć etap eliminacji w 28. dniu etapu absorpcji.

19. Stałą tempa absorpcji, stałą tempa eliminacji (lub stałe, jeśli zastosowano bardziej złożone modele), kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAF_K) oraz, jeśli to możliwe, granice ufności każdego z tych parametrów oblicza się za pomocą komputerowych modeli równań (zob. dodatek 2 dotyczący modeli). Odpowiedniość dopasowania modelu można określić na podstawie współczynnika korelacji lub współczynnika determinacji (współczynniki o wartościach zbliżonych do 1 wskazują na dobre dopasowanie).

20. Aby zmniejszyć zróżnicowanie wyników badania w odniesieniu do substancji organicznych o wysokim poziomie lipofilności, współczynniki bioakumulacji należy dodatkowo wyrazić w odniesieniu do zawartości lipidów w organizmach użytych do badania oraz do węgla organicznego (TOC) w osadzie (współczynnik bioakumulacji organizmy żywe-osad (BASF) w kg całkowitego węgla organicznego w osadzie na kg^{-1} zawartości lipidów w organizmach). Takie podejście jest oparte na doświadczeniach i teoretycznych zależnościach dla przedziału wodnego, w przypadku którego – w odniesieniu do niektórych klas substancji chemicznych – istnieje wyraźne powiązanie między zdolnością do bioakumulacji a lipofilnością, co zostało dobrze udowodnione w odniesieniu do ryb jako organizmów modelowych (14)(25)(27). Istnieje również związek między zawartością lipidów w badanych rybach a bioakumulacją takich substancji. W przypadku organizmów żyjących w osadzie stwierdzono podobne korelacje (15)(16)(17)(18). Jeśli dostępna jest wystarczająca ilość tkanek organizmów, zawartość lipidów w zwierzętach użytych do badania można określić z wykorzystaniem tego samego materiału biologicznego, który wykorzystano do określenia stężenia badanej substancji. Praktyczne jest wykorzystywanie zaaklimatyzowanych zwierząt z próby kontrolnej, przynajmniej na początku, lub – najlepiej – na końcu etapu absorpcji, w celu zmierzenia zawartości lipidów, która może następnie zostać wykorzystana do normalizowania wartości współczynnika bioakumulacji.

WAŻNOŚĆ BADANIA

21. Aby badanie było ważne, zastosowanie mają następujące warunki:

— łączna śmiertelność organizmów (w próbach kontrolnych i poddanych działaniu substancji) na koniec badania nie powinna przekraczać 20 % początkowej liczby.

— ponadto należy wykazać, że organizmy zakopują się w osadzie, co umożliwia maksymalne narażenie. Szczegółowe informacje podano w pkt 28.

▼M6

OPIS METODY

Badane gatunki

22. W badaniu można wykorzystać kilka gatunków skąposzczetów wodnych. Najczęściej wykorzystywane gatunki wymieniono w dodatku 6.

23. Badania toksyczności (96 h, tylko w wodzie) należy wykonywać w regularnych odstępach czasu (np. co miesiąc), stosując toksyczną substancję odniesienia, taką jak chlorek potasu (KCl) lub siarczan miedzi ($CuSO_4$), w celu wykazania stanu zdrowia zwierząt użytych do badania (1)(6). Jeżeli nie przeprowadza się referencyjnych badań toksyczności w regularnych odstępach czasu (np. co miesiąc), partię organizmów, które mają być wykorzystane w badaniu bioakumulacji osadu, należy sprawdzać z użyciem toksycznej substancji odniesienia. Pomiar zawartości lipidów może również dostarczyć przydatnych informacji na temat stanu zwierząt.

Hodowla organizmów użytych do badania

24. Aby zapewnić wystarczającą liczbę organizmów do wykonania badań bioakumulacji, może być konieczne przetrzymywanie ich w stałej hodowli laboratoryjnej jednego gatunku. Metody dotyczące hodowli laboratoryjnej wybranych badanych gatunków przedstawiono w dodatku 6. Szczegółowe informacje zob. pozycje bibliografii (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Aparatura

25. Należy dołożyć starań, aby w odniesieniu do wszystkich części sprzętu unikać stosowania materiałów, które mogą spowodować rozpuszczenie, wchłonięcie lub wypłukanie badanych substancji lub innych substancji i mają niekorzystny wpływ na zwierzęta użyte do badań. Można zastosować standardowe prostokątne lub cylindryczne naczynia, wykonane z chemicznie obojętnego materiału i posiadające odpowiednią pojemność, zgodnie ze wskaźnikiem obciążenia, tj. liczbą organizmów, jaką można wykorzystać w badaniu. Należy unikać stosowania rur z miękkiego tworzywa sztucznego do doprowadzania wody lub powietrza. Sprzęt mający kontakt z badanymi podłożami może być wykonany z politetrafluoroetylenu, ze stali nierdzewnej lub szkła. W przypadku substancji o wysokich współczynnikach adsorpcji, takich jak syntetyczne pyretroidy, konieczne może być zastosowanie szkła silanizowanego. W takich sytuacjach sprzęt po użyciu należy wyrzucić (5). W przypadku oznakowanych izotopowo substancji badanych i w przypadku substancji lotnych należy zachować ostrożność w celu uniknięcia odpędzenia i ucieczki odpędzanej substancji badanej. Należy zastosować pułapki (np. szklane płuczki gazowe) zawierające odpowiednie absorbenty zatrzymujące wszelkie pozostałości odparowujące z komór badawczych (11).

Woda

26. Warstwa wody nadosadowej powinna mieć jakość, która pozwoli na przetrwanie badanych gatunków przez okres trwania aklimatyzacji i okres badań oraz nie będzie powodowała pojawienia się u ich nietypowego wyglądu lub zachowania. Zgodnie z metodą badania C.1 (25), jako wodę nadosadową w badaniach oraz hodowlach laboratoryjnych organizmów zaleca się stosować wodę regenerowaną. Wykazano, że w takiej wodzie przeżyć, rozwijać się i rozmnażać może kilka gatunków badanych (8), a także zapewnia się w ten sposób maksymalną standaryzację warunków badania i hodowli. Wodę należy scharakteryzować przynajmniej pod względem pH, przewodności właściwej i twardości. Użytecznych informacji powinna dostarczyć także analiza wody pod kątem mikrozanieczyszczeń przeprowadzona przed zastosowaniem (dodatek 4).

27. W czasie badania jakość wody powinna być stała. pH wody nadosadowej powinno wynosić 6–9. Na początku badania całkowita twardość powinna wynosić 90–400 mg $CaCO_3$ na litr (7). Zakresy pH i twardości wspomnianej wody regenerowanej podano w metodzie badania C.1 (25). Jeśli jednak

▼M6

zachodzi podejrzenie, że między jonami powodującymi twardość wody a substancją badaną dochodzi do interakcji, powinna być stosowana woda o mniejszej twardości. W dodatku 4 zestawiono dodatkowe kryteria dla wody nadającej się do rozcieńczania według wytycznej OECD nr 210 w sprawie badań (34).

Osad

28. Osad powinien być takiej jakości, która pozwoli na przeżycie, a także rozmnażanie się organizmów użytych do badania w okresie aklimatyzacji i badanych okresów, przy czym organizmy nie powinny charakteryzować się nietypowym wyglądem ani zachowaniem. Organizmy powinny zakopywać się w osadzie. Zakopywanie się może mieć wpływ na narażenie i w związku z tym na BAF. W związku z tym unikanie osadu i zachowania organizmów użytych do badania związane z zakopywaniem się w glebie należy obserwować i odnotowywać, jeżeli mętność warstwy wody nadosadowej umożliwia takie obserwacje. Organizmy (kontrolne i poddane działaniu substancji) powinny zakopać się w osadzie w ciągu 24 h po dodaniu do naczyń badawczych. Jeżeli zaobserwuje się, że organizmy nie zakopują się w osadzie lub unikają osadu (np. ponad 20 % organizmów przez ponad połowę etapu absorpcji), oznacza to, że warunki badania nie są odpowiednie lub organizmy użyte do badań nie są zdrowe, lub że zachowanie to jest wywoływane przez stężenie badanej substancji. W takim przypadku badanie należy przerwać i powtórzyć w poprawionych warunkach. Dodatkowe informacje na temat zjadania osadu można uzyskać stosując metody opisane w (35)(36), które określają zjadanie osadu lub wybór cząstek u organizmów użytych do badania. Jeżeli możliwe jest zaobserwowanie na powierzchni osadu co najmniej obecności lub braku obecności granulek odchodów, które wskazują na zjadanie osadu przez organizmy, należy to odnotować i uwzględnić w interpretacji wyników badania w związku z drogami narażenia.

29. W tym badaniu i w hodowlach laboratoryjnych organizmów zaleca się wykorzystanie sztucznego osadu opartego na sztucznej glebie opisanej w metodzie badawczej C.8 (40) (dodatek 5), ponieważ naturalne osady o właściwej jakości mogą nie być dostępne przez cały rok. Dodatkowo na badanie mogą mieć wpływ organizmy rodzime oraz obecność mikrozanieczyszczeń w naturalnym osadzie. W sztucznym osadzie przeżyć, rozwijać się i rozmnażać może szereg badanych gatunków (8).

30. Sztuczny osad należy scharakteryzować przynajmniej pod względem pochodzenia składników, rozkładu wielkości ziaren (procent piasku, mułu i gliny), zawartości węgla organicznego (TOC), zawartości wody i pH. Pomiar potencjału redoks jest nieobowiązkowy. Naturalne osady z niezanieczyszczonych miejsc mogą jednak również posłużyć jako osad badany lub jako osad do hodowli (1). Osady naturalne należy scharakteryzować, podając co najmniej ich pochodzenie (miejsce zebrania), pH i zawartość amoniaku w wodzie porowej, zawartość węgla organicznego (TOC), rozkład wielkości ziaren (procent piasku, iłu i gliny) oraz procentową zawartość wilgoci (6). Zaleca się także, aby przed wzbogaceniem badaną substancją naturalny osad był przez siedem dni kondycjonowany w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania, jeżeli przewiduje się powstawanie amoniaku. Na koniec okresu kondycjonowania należy usunąć i odrzucić wodę nadosadową. Użytecznych informacji powinna dostarczyć także analiza osadu lub jego składników pod kątem mikrozanieczyszczeń przeprowadzona przed zastosowaniem.

Przygotowanie

31. Postępowanie z naturalnymi osadami przed ich zastosowaniem w laboratorium opisano w (1)(6)(44). W dodatku 5 podano sposób przygotowania sztucznego osadu.

▼M6

Przechowywanie

32. W przypadku osadów naturalnych okres ich przechowywania w laboratorium powinien być możliwie jak najkrótszy. U.S. EPA (6) zaleca, aby maksymalny okres przechowywania wynosił 8 tygodni i aby przechowywać osad bez dostępu światła w temperaturze 4 ± 2 °C. W pojemnikach do przechowywania nie powinno być żadnej fazy gazowej nad osadem. Zalecenia dotyczące przygotowania sztucznego osadu podano w dodatku 5.

Stosowanie substancji badanej

33. Osad wzbogaca się badaną substancją. Procedura wzbogacania obejmuje pokrycie badaną substancją jednego lub większej liczby składników osadu. Na przykład piasek kwarcowy lub jego część (np. 10 g piasku kwarcowego na naczynie badawcze) można namoczyć w roztworze badanej substancji w odpowiednim rozpuszczalniku, który następnie powoli odparuje do sucha. Taką powleczoną frakcję można następnie wymieszać z mokrym osadem. Należy mieć na uwadze, że przygotowując osad należy uwzględniać piasek zawarty w mieszance substancji badanej z piaskiem, tj. osad należy przygotować z mniejszą ilością piasku (6).

34. W przypadku zastosowania osadu naturalnego badaną substancję można dodać, wzbogacając wysuszoną na powietrzu część osadu, zgodnie z opisem dotyczącym sztucznego osadu powyżej, lub mieszając badaną substancję z mokrym osadem, następnie odparowując ewentualnie zastosowany środek rozpuszczający. Rozpuszczalniki nadające się do wzbogacania mokrego osadu to etanol, metanol, eter monometylowy glikolu etylenowego, eter dimetylenowy glikolu etylenowego, dimetyloformamid i glikol trietylenowy (5)(34). Toksyczność i lotność rozpuszczalnika oraz rozpuszczalność badanej substancji w wybranym rozpuszczalniku powinny być głównymi kryteriami branymi pod uwagę przy wyborze odpowiedniego środka rozpuszczającego. Dodatkowe wytyczne dotyczące procedur wzbogacania podano w Environment Canada (1995)(41). Należy dopilnować, by substancja badana dodana do osadu została w nim dokładnie i równo rozprowadzona. Stanowiące kontrpróby podpróbki wzbogaconego osadu należy poddać analizie w celu sprawdzenia stężeń badanej substancji w osadzie i oznaczenia stopnia jednorodności rozprowadzenia substancji.

35. Po przygotowaniu wzbogaconego osadu z warstwą wody nadosadowej należy umożliwić rozdzielenie substancji badanej między fazę wodną i osad. W miarę możliwości powinno się to odbywać w takich samych warunkach temperatury i napowietrzenia, jakie zastosowano na potrzeby badania. Okres ustalania stanu równowagi zależy od osadu i substancji i może być rzędu kilku godzin lub kilku dni, a w rzadkich przypadkach trwać do kilku tygodni (4–5 tygodni) (28)(42). W tym badaniu nie oczekuje się stanu równowagi, ale zaleca się stosowanie okresu ustalania równowagi trwającego od 48 godzin do 7 dni. W zależności od celu badania, na przykład, jeśli dąży się do odtworzenia warunków środowiskowych, wzbogacony osad może być „postarzany” przez dłuższy okres (11).

WYKONANIE BADANIA

Badanie wstępne

36. Może być ono przydatne dla wykonania wstępnego doświadczenia w celu zoptymalizowania warunków badania ostatecznego, np. jeżeli chodzi o wybór stężenia (stężeń) substancji i czas trwania fazy absorpcji i eliminacji. Zachowanie organizmów, na przykład unikanie osadu, tj. organizmy uciekają od osadu, co może być spowodowane przez badaną substancję lub sam osad,

▼M6

należy obserwować i odnotowywać w trakcie badania wstępnego. Unikanie osadu można również zastosować jako parametr subletalny w badaniu wstępnym w celu oszacowania stężeń badanej substancji, które mają być zastosowane w badaniu bioakumulacji.

Warunki narażenia

Czas trwania etapu absorpcji

37. Na etapie absorpcji organizmy użyte do badań są narażone na działanie badanej substancji. Pierwszą próbkę należy pobrać po 4–24 godzinach po rozpoczęciu etapu absorpcji. Etap absorpcji powinien trwać 28 dni (1)(6)(11), chyba że można udowodnić, że równowagę osiągnięto wcześniej. Stan ustalony ma miejsce wówczas, gdy: (i) wykres współczynników bioakumulacji w każdym okresie pobierania próbek w funkcji czasu jest równoległy do osi czasu, (ii) trzy następujące po sobie analizy współczynnika stężenia wykonane na próbkach pobranych w odstępach co najmniej dwóch dni nie różnią się od siebie więcej niż o ± 20 %, (iii) nie ma istotnych różnic między trzema okresami pobierania próbek (na podstawie porównań statystycznych, np. analizy wariancji i analizy regresji). Jeżeli stan ustalony nie został osiągnięty w ciągu 28 dni, etap absorpcji można zakończyć, rozpoczynając etap eliminacji, a BAF_K można obliczyć na podstawie stałych tempa absorpcji i eliminacji (zob. również pkt 16–18).

Czas trwania etapu eliminacji

38. Pierwszą próbkę należy pobrać po 4–24 godzinach od rozpoczęciu etapu eliminacji, ponieważ w okresie wstępnym mogą zachodzić gwałtowne zmiany w pozostałościach w tkankach. Zaleca się zakończyć etap eliminacji, gdy stężenie badanej substancji wynosi mniej niż 10 % stężenia w stanie ustalonym albo po maksymalnym czasie trwania wynoszącym 10 dni. Poziom pozostałości w organizmach pod koniec etapu eliminacji podaje się w sprawozdaniu jako drugorzędny punkt końcowy. Okres ten może jednak zależeć od okresu, przez który stężenie badanej substancji u organizmów pozostaje powyżej analitycznych granic wykrywalności.

Organizmy użyte do badań

Liczby badanych organizmów

39. Liczba organizmów w próbce musi zapewnić taką masę tkanki organizmów, aby masa badanej substancji w próbce odpowiednio na początku etapu absorpcji i na końcu etapu eliminacji była znacząco wyższa niż granica wykrywalności badanej substancji w materiale biologicznym. Na wspomnianych etapach absorpcji i eliminacji stężenie u zwierząt użytych do badania jest zazwyczaj stosunkowo niskie (6)(8)(18). W związku z tym, że masa ciała pojedynczych osobników u wielu gatunków wodnych skąposzczetów jest bardzo niska (5–10 mg mokrej masy na osobnika w przypadku *Lumbriculus variegatus* i *Tubifex tubifex*), organizmy z danej komory badawczej stanowiącej kontrpróbę można połączyć w celu zważenia i wykonania analizy badanej substancji chemicznej. W przypadku badanych gatunków o wyższej masie pojedynczych osobników (np. *Branchiura sowerbyi*) można wykorzystywać kontrpróby zawierające jednego osobnika, jednak w takich przypadkach liczba kontrprób powinna zostać zwiększona do pięciu na punkt pobierania próbek (11). Należy jednak zauważyć, że *B. sowerbyi* nie został uwzględniony w badaniu międzylaboratoryjnym (12) i w związku z tym nie zaleca się wykorzystywania go jako gatunku preferowanego w tej metodzie.

40. Należy wykorzystywać organizmy o podobnej wielkości (w przypadku *L. variegatus* zob. dodatek 6). Powinny one pochodzić z tego samego źródła, a także powinny być dorosłymi lub dużymi zwierzętami należącymi do tej samej grupy wiekowej (zob. dodatek 6). W związku z tym, że masa i wiek zwierzęcia mogą mieć istotny wpływ na wartości współczynnika bioakumulacji (np. z powodu różnej zawartości lipidów lub obecności jaj), te parametry należy dokładnie zanotować. Zaleca się zważenie podpróbki organizmów przed rozpoczęciem badania w celu oszacowania ich średniej mokrej i suchej masy.

▼M6

41. W przypadku *Tubifex tubifex* i *Lumbriculus variegatus* można spodziewać się, że będą się rozmnażać w czasie badania. Brak rozmnażania w badaniu bioakumulacji należy odnotować i uwzględnić podczas interpretacji wyników badania.

Obciążenie

42. Należy zastosować wysoki stosunek osadu do organizmów i wody do organizmów, aby ograniczyć do minimum spadek stężenia badanej substancji w osadzie na etapie absorpcji i uniknąć spadków stężenia rozpuszczonego tlenu. Wybrany wskaźnik obciążenia powinien również odpowiadać naturalnie występującym zagęszczeniom populacji wybranych gatunków (43). Na przykład dla *Tubifex tubifex* zaleca się, aby wskaźnik obciążenia wynosił 1–4 mg tkanki organizmów (mokra masa) na gram mokrego osadu (8)(11). W pozycjach bibliografii (1) i (6) w przypadku *L. variegatus* zaleca się poziom obciążenia ≤ 1 g suchej masy tkanki organizmów na 50 g węgla organicznego w osadzie.

43. Organizmy, które mają być użyte w badaniu, usuwa się z hodowli przesiewając osad hodowli. Zwierzęta (dorosłe lub duże organizmy bez oznak niedawnej fragmentacji) zostają przeniesione do szklanych naczyń (np. na płytki Petriego) zawierających czystą wodę. Jeśli warunki badania różnią się od warunków hodowli, etap aklimatyzacji trwający 24 godziny powinien być wystarczający. Przed ważeniem należy usunąć z organizmów nadmiar wody. Można to zrobić, delikatnie umieszczając organizmy na wstępnie nawilżonej bibule. Do osuszania organizmów nie zaleca się stosowania papieru chłonnego, ponieważ może to narazić je na stres lub uszkodzenie. Brunson i in. (1998) zalecali wykorzystywanie nieosuszonych organizmów o masie stanowiącej około 1.33-krotności biomasy docelowej. Te dodatkowe 33 % odpowiada różnicy między osuszonymi i nieosuszonymi organizmami (28).

44. Na początku etapu absorpcji (dzień 0 badania) organizmy użyte do badań wyjmuje się z komory aklimatyzacyjnej i rozmieszcza losowo w naczyniach (np. na płytkach Petriego) zawierających wodę regenerowaną, dodając do każdego naczynia po dwa organizmy, dopóki w każdym naczyniu nie znajdzie się dziesięć organizmów. Każdą z tych grup organizmów następnie przenosi się losowo do oddzielnych naczyń, np. za pomocą delikatnej stalowej pęsety. Naczynia badawcze następnie inkubuje się w warunkach badania.

Karmienie

45. W związku z niską zawartością składników odżywczych w sztucznym osadzie należy zmodyfikować osad, dodając do niego źródło pokarmu. Aby uniknąć niedoszacowania narażenia organizmów użytych do badania, np. na skutek wybiórczego żerowania na niezanieczyszczonym pokarmie, pokarm niezbędny do rozmnażania i wzrostu organizmów użytych do badania należy dodać do osadu jednorazowo przed dodaniem lub podczas dodawania badanej substancji (zob. dodatek 5).

Stosunek osad-woda

46. Zalecany stosunek osad-woda wynosi 1:4 (45). Stosunek ten uznaje się za właściwy do utrzymania stężenia tlenu na właściwych poziomach i uniknięcia odkładania się amoniaku w wodzie nadosadowej. Zawartość tlenu w wodzie nadosadowej należy utrzymać na poziomie ≥ 40 % nasycenia. Woda nadosadowa w naczyniu badawczym powinna być delikatnie napowietrzana (np. 2–4 pęcherzyki powietrza na sekundę) przez pipetę Pasteura, której koniec znajduje się około 2 cm nad powierzchnią osadu w celu zminimalizowania zakłóceń osadu.

▼M6

Światło i temperatura

47. Fotoperiod w hodowli i w badaniu wynosi 16 godzin (1)(6). Natężenie światła w obszarze badania należy utrzymywać na poziomie około 500–1 000 lx. Temperatura powinna wynosić 20 ± 2 °C przez cały czas trwania badania.

Badane stężenia

48. Jedno badane stężenie (jak najniższe) wykorzystuje się do oznaczenia kinetyki absorpcji, można jednak wykorzystać drugie (wyższe) stężenie (np. (46)). W takim przypadku próbki pobiera się i analizuje w stanie ustalonym lub po 28 dniach w celu potwierdzenia współczynnika bioakumulacji zmierzonego przy niższym stężeniu (11). Należy wybrać wyższe stężenie, aby można było wykluczyć szkodliwe skutki (np. wybierając ok. 1 % najniższego znanego stężenia, przy którym obserwuje się przewlekłe zmiany EC_x, przyjętego z badań przewlekłej toksyczności). Niższe badane stężenie powinno być znacznie wyższe niż granica wykrywalności w próbkach osadu i próbkach biologicznych z zastosowaniem metody analitycznej. Jeśli stężenie badanej substancji powodujące zmiany jest zbliżone do analitycznej granicy wykrywalności, zaleca się stosowanie badanej substancji oznakowanej izotopowo z wysokim poziomem promieniotwórczości właściwej.

Kontrpróby poddane działaniu substancji i kontrpróby kontrolne

49. Minimalna liczba kontrprób poddanych działaniu substancji na potrzeby pomiarów kinetycznych na etapach absorpcji i eliminacji powinna wynosić trzy na jeden punkt pobierania próbek (11). Należy wykorzystać dodatkowe kontrpróby, np. na potrzeby nieobowiązkowych dodatkowych dni pobierania próbek. W odniesieniu do etapu eliminacji przygotowuje się dopasowaną liczbę kontrprób z niewzbogaconym osadem i wodą nadosadową, aby pod koniec etapu absorpcji organizmy poddane działaniu substancji można było przenieść z oznaczonych naczyń z substancją do naczyń bez substancji. Całkowita liczba kontrprób poddanych działaniu substancji powinna być wystarczająca na potrzeby etapów absorpcji i eliminacji.

50. Ewentualnie organizmy wyznaczone do pobrania próbki podczas etapu eliminacji można poddać działaniu substancji w jednym dużym pojemniku, zawierającym wzbogacony osad z tej samej partii, którą wykorzystano do kinetyki absorpcji. Należy wykazać, że warunki badania (np. głębokość osadu, stosunek osad-woda, obciążenie, temperatura, jakość wody) są porównywalne z kontrpróbami wyznaczonymi do etapu absorpcji. Na zakończenie etapu absorpcji woda, osad i próbki organizmów należy pobrać z tego pojemnika do analizy, a wystarczającą liczbę dużych organizmów, które nie wykazują oznak niedawnej fragmentacji, należy ostrożnie wyjąć i przenieść do kontrprób przygotowanych do etapu eliminacji (np. po dziesięć organizmów na naczynie z kontrpróbą).

51. Jeżeli nie zastosowano żadnego innego rozpuszczalnika niż woda, należy zapewnić co najmniej 9 kontrprób ujemnej próby kontrolnej (co najmniej 3 pobrane na początku, 3 pobrane na końcu absorpcji i 3 pobrane na końcu eliminacji) w celu analizy biologicznej i analizy tła. Jeśli do zastosowania badanej substancji wykorzystano środek rozpuszczający, należy wykonać próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem (co najmniej 3 kontrpróby należy pobrać na początku i 3 na końcu etapu absorpcji oraz 3 na końcu etapu eliminacji). W takim przypadku należy zapewnić także cztery kontrpróby ujemnej próby kontrolnej (bez rozpuszczalnika) na potrzeby pobierania próbek na koniec etapu absorpcji. Takie kontrpróby można porównać pod kątem parametrów biologicznych z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem w celu uzyskania informacji na temat ewentualnego wpływu rozpuszczalnika na organizmy użyte do badań. Szczegóły podano w dodatku 3.

▼M6

Częstotliwość pomiarów jakości wody

52. Na etapach absorpcji i eliminacji należy wykonać pomiary co najmniej następujących parametrów jakości wody w warstwie wody nadosadowej:

Temperatura	w jednym naczyniu na każdy poziom narażenia w dniach pobierania próbek i w jednym naczyniu kontrolnym raz na tydzień oraz na początku i na końcu okresu absorpcji i eliminacji; można również odnotować temperaturę otaczającego środowiska (powietrze atmosferyczne lub łaźnia wodna) lub w jednym reprezentatywnym naczyniu badawczym, np. w sposób ciągły lub co godzinę;
Zawartość rozpuszczonego tlenu	w jednym naczyniu na każdy poziom narażenia i w jednym naczyniu kontrolnym w dniach pobrania próbek; wyrażona w mg/L i % ASV (wartości nasycenia powietrzem);
Doprowadzenie powietrza	kontrolowane co najmniej raz dziennie (w dni robocze) i w razie potrzeby korygowane;
pH	w jednym naczyniu na każdy poziom narażenia w dniach pobierania próbek i w jednym naczyniu kontrolnym raz na tydzień oraz na początku i na końcu okresu absorpcji i eliminacji;
Całkowita twardość wody	co najmniej w jednym naczyniu poddanym narażeniu i w jednym naczyniu kontrolnym na początku i na końcu okresu absorpcji i eliminacji, wyrażona w mg/l $CaCO_3$;
Całkowita zawartość amoniaku	co najmniej w jednym naczyniu poddanym narażeniu i w jednym naczyniu kontrolnym na początku i na końcu okresu absorpcji i eliminacji, wyrażona w mg/l NH_4^+ lub NH_3 lub jako amoniak całkowity.

Pobieranie próbek oraz analiza organizmów, osadu i wody

Harmonogram pobierania próbek

53. Przykłady harmonogramów pobierania próbek, dla etapu absorpcji trwającego 28 dni i etapu eliminacji trwającego 10 dni, przedstawiono w dodatku 3.

54. Pobrać próbki wody i osadu z komór badawczych w celu określenia stężenia badanej substancji przed dodaniem organizmów oraz na etapie absorpcji i etapie eliminacji. Podczas badania oznacza się stężenia substancji badanej w organizmach, osadzie i wodzie w celu monitorowania rozmieszczenia badanej substancji w przedziałach układu badawczego.

55. Próbki organizmów, osadu i wody należy pobrać co najmniej sześć razy na etapie absorpcji i eliminacji.

56. Kontynuować pobieranie próbek do momentu osiągnięcia stanu równowagi (stanu ustalonego) (zob. dodatek 1) lub przez 28 dni. Jeżeli stan równowagi nie zostanie osiągnięty przez 28 dni, należy rozpocząć etap eliminacji. Rozpoczynając etap eliminacji, przenieść oznaczone organizmy do stanowiących kontrpróby komór zawierających osad i wodę nie poddane działaniu substancji (zob. pkt 17 i 18).

Pobieranie i przygotowywanie próbek

57. Pobrać próbki wody, dekantując, syfonując lub pobierając pipetą objętość wystarczającą do zmierzenia ilości badanej substancji w próbce.

58. Pozostałą wodę nadosadową ostrożnie dekantuje się lub usuwa przez syfon z komory lub komór badawczych. Próbki osadu należy pobierać ostrożnie, tak aby w jak najmniejszym stopniu zakłócić spokój organizmów.

▼M6

59. Wyjąć wszystkie organizmy z badanej kontrpróby w czasie pobierania próbek, np. zawieszając osad w warstwie wody nadosadowej i rozprowadzając zawartość każdej kontrpróby na płytkiej tacy i wybierając organizmy za pomocą delikatnych stalowych szczypczyków. Opłukać je szybko wodą na płytkiej szklanej lub stalowej tacy. Usunąć nadmiar wody. Następnie ostrożnie przenieść organizmy do zważonego uprzednio naczynia i zważyć je. Uśmiercić organizmy przez zamrożenie (np. w temperaturze ≤ – 18 °C). Należy zanotować obecność i liczbę kokonów lub młodych osobników.

60. Zasadniczo organizmy należy ważyć i uśmiercać natychmiast po pobraniu próbki z pominięciem etapu opróżniania przewodu pokarmowego w celu otrzymania konserwatywnego współczynnika bioakumulacji, który obejmuje zanieczyszczoną zawartość układu pokarmowego, i w celu uniknięcia strat pozostałości w ciele na etapie opróżniania przewodu pokarmowego w samej wodzie (8). Nie oczekuje się istotnego wyeliminowania substancji o wartości log K_{ow} powyżej 5 na którymkolwiek etapie opróżniania przewodu pokarmowego w samej wodzie, chociaż substancje o wartości log K_{ow} niższej niż 4 mogą być tracone w znacznych ilościach (47).

61. Na etapie eliminacji organizmy wypróżniają się do czystego osadu. Oznacza to, że pomiary wykonane bezpośrednio przed etapem eliminacji obejmują zanieczyszczoną zawartość układu pokarmowego, chociaż po pierwszych 4–24 h etapu eliminacji zakłada się, że większość zanieczyszczonej zawartości układu pokarmowego zostaje zastąpiona czystym osadem (11)(47). Stężenie w organizmach z tej próbki można wówczas uznać za stężenie w tkance po opróżnieniu układu pokarmowego. Aby uwzględnić rozcieńczenie stężenia badanej substancji przez niezanieczyszczony osad na etapie eliminacji, masę zawartości układu pokarmowego można oszacować na podstawie stosunku mokrej masy organizmu/masy popiołu z organizmu lub suchej masy organizmów/masy popiołu z organizmu.

62. Jeżeli celem szczegółowego badania jest zmierzenie biodostępności i faktycznej pozostałości w tkankach organizmów użytych do badania, wówczas należy pobrać podpróbkę organizmów wykorzystanych w badaniu (np. z trzech dodatkowych naczyń z kontrpróbami), najlepiej podczas stanu ustalonego, oraz zważyć je, oczyścić z zawartości układu pokarmowego w czystej wodzie przez okres 6 godzin (47) i ponownie zważyć przed analizą. Dane dotyczące masy organizmów i stężenia w ich ciele w przypadku tej podpróbki można następnie porównać z wartościami otrzymanymi z niewypróżnionych organizmów. Aby zminimalizować dodatkowy stres, na który narażone są zwierzęta, układy pokarmowe organizmów wyznaczonych do pomiaru eliminacji nie powinny być wypróżnione przed przeniesieniem do czystego osadu.

63. Najlepiej jest analizować wodę, osad i próbki organizmów bezpośrednio (tj. w ciągu 1–2 dni) po usunięciu, aby zapobiec rozkładowi lub innym stratom, a także w celu obliczenia przybliżonego tempa absorpcji i eliminacji w trakcie trwania badania. Bezpośrednia analiza pozwala również uniknąć opóźnień w określaniu momentu osiągnięcia stanu równowagi.

64. Jeżeli analizy nie wykona się bezpośrednio, próbki należy przechowywać we właściwych warunkach. Przed rozpoczęciem badania należy uzyskać informacje na temat stabilności i właściwych warunków przechowywania określonej substancji badanej (np. czasu i temperatury przechowywania, procedur ekstrakcji itd.). Jeżeli takie informacje nie są dostępne, a uznaje się je za niezbędne, można równolegle wykonać badanie wzbogaconych tkanek kontrolnych w celu ustalenia stabilności przechowywania.

Jakość metody analitycznej

65. Ze względu na to, że cała procedura uzależniona jest zasadniczo od dokładności, precyzji i czułości metody analitycznej wykorzystywanej w odniesieniu do badanej substancji, należy sprawdzić doświadczalnie, czy precyzja oraz powtarzalność analizy chemicznej, a także odzysk badanej substancji

▼M6

z wody, osadu i z organizmów są wystarczające w odniesieniu do danej metody. Należy także sprawdzić, czy badana substancja nie jest wykrywalna w komorach z próbami kontrolnymi w stężeniach wyższych niż tło. W razie konieczności należy skorygować wartości C_w, C_s i C_a w odniesieniu do odzysków i wartości tła prób kontrolnych. Przez cały czas trwania badania ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się w taki sposób, by zminimalizować ich zanieczyszczenie i straty (np. wynikające z adsorpcji badanej substancji na przyrządzie do pobierania próbek).

66. Odzysk całkowity oraz odzysk badanej substancji w organizmach, osadzie, wodzie, a także, jeśli zastosowano, w pułapkach zawierających absorbenty umożliwiające zatrzymanie odparowującej badanej substancji, należy zanotować i zamieścić w sprawozdaniu.

67. W związku z tym, że zaleca się stosowanie substancji oznakowanej izotopowo, można przeprowadzić analizę całkowitej radioaktywności (np. substancji macierzystej i produktów degradacji). Jeżeli jednak jest to możliwe pod względem analitycznym, oznaczenie ilościowe substancji macierzystej i produktów degradacji w stanie ustalonym lub na końcu etapu absorpcji może dostarczyć ważnych informacji. Jeżeli zamierza się wykonać takie pomiary, próbki należy wówczas poddać właściwym procedurom ekstrakcji, aby można było oddzielnie przeprowadzić oznaczanie ilościowe substancji macierzystej. W przypadku gdy wykryty produkt degradacji stanowi znaczą procentową część (np. >10 %) radioaktywności mierzonej w organizmach użytych do badania w stanie ustalonym lub na koniec etapu absorpcji, zaleca się dokonanie identyfikacji takich produktów degradacji (5).

68. W związku z niską indywidualną biomasą często nie jest możliwe oznaczenie stężenia badanej substancji w każdym organizmie, chyba że jako gatunek badany wykorzystuje się *Branchiura sowerbyi* (40–50 mg mokrej masy na organizm) (11). Łączenie osobników pobranych z konkretnego naczynia badawczego jest dopuszczalne, ale ogranicza procedury statystyczne, które można zastosować do danych. Jeśli istotne jest zastosowanie konkretnej procedury statystycznej i mocy statystycznej, należy w badaniu zastosować odpowiednią liczbę zwierząt lub komór badawczych z kontrpróbami w celu pogodzenia pożądanego łączenia, procedury i mocy.

69. Zaleca się, by współczynnik bioakumulacji był wyrażony zarówno jako funkcja całkowitej mokrej masy, całkowitej suchej masy oraz, w razie konieczności (np. w przypadku wysoce lipofilnych substancji), jako funkcja zawartości lipidów i zawartości całkowitego węgla organicznego w osadzie. Do oznaczenia zawartości lipidów należy zastosować odpowiednie metody (48)(49). Jako standardową metodę (48) można zalecać metodę ekstrakcji chloroformem/metanolem (50). Aby jednak uniknąć stosowania rozpuszczalników chlorowanych, należy zastosować potwierdzoną w badaniu międzylaboratoryjnym metodę Bligha i Dyera (50) zgodnie z opisem w (51). Ponieważ różne metody nie dają identycznych wartości (48), ważne jest podanie szczegółów dotyczących wykorzystanej metody. Jeśli jest to możliwe, tj. jeśli jest dostępna wystarczająca ilość tkanki organizmów, pomiar zawartości lipidów należy przeprowadzić z użyciem tej samej próbki lub ekstraktu, których użyto do analizy badanej substancji, ponieważ lipidy często należy usuwać z ekstraktu przed jego analizą chromatograficzną (5). Praktyczne jest jednak wykorzystywanie zaaklimatyzowanych zwierząt z próby kontrolnej co najmniej na początku lub – najlepiej – na końcu etapu absorpcji do pomiaru zawartości lipidów, np. w trzech próbkach.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

70. Krzywą absorpcji badanej substancji uzyskuje się, wykreślając w skali arytmetycznej jej stężenia w/na organizmach na etapie absorpcji w funkcji czasu.

▼M6

Jeżeli krzywa osiągnie stan równowagi, należy obliczyć BAF_{ss} dla stanu ustalonego:

$$\frac{C_a \text{ w stanie ustalonym lub w 28. dniu (średnia)}}{C_a \text{ w stanie ustalonym lub w 28. dniu (średnia)}}$$

71. Należy określić kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAFK) jako stosunek ks/ke. Stałą szybkości eliminacji (ke) określa się zazwyczaj na podstawie krzywej eliminacji (tj. wykresu stężenia badanej substancji w organizmach na etapie eliminacji). Stałą szybkości absorpcji ks oblicza się następnie na podstawie kinetyki krzywej absorpcji. Preferowaną metodą uzyskania BAFK oraz stałych szybkości, ks i ke, jest zastosowanie nieliniowych komputerowych metod estymacji parametrycznej (zob. dodatek 2). Jeśli w sposób ewidentny eliminacja nie jest procesem pierwszego rzędu, należy zastosować bardziej złożone modele (25)(27)(52).

72. Współczynnik bioakumulacji organizmy żywe-osad (BSAF) określa się przez normalizację BAFK dla zawartości lipidów w organizmach i zawartości całkowitego węgla organicznego w osadzie.

Interpretacja wyników

73. Wyniki powinny być interpretowane z rozwagą w przypadku, gdy mierzone badane stężenia występują na poziomach zbliżonych do granicy wykrywalności metody analitycznej.

74. Jasno określone krzywe absorpcji i eliminacji wskazują na dobrej jakości dane bioakumulacji. Ogólnie granice ufności dla wartości BAF uzyskanych w ramach dobrze zaprojektowanego podejścia badawczego nie powinny przekraczać 25 % (5).

Sprawozdanie z badania

75. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje.

Badana substancja

— cechy fizyczne i własności fizykochemiczne, np. log K_{ow},, rozpuszczalność w wodzie;

— dane dotyczące tożsamości substancji chemicznej; źródło badanej substancji, nazwy i stężenie wszelkich zastosowanych rozpuszczalników;

— w przypadku zastosowania badanej substancji oznakowanej izotopowo, dokładne położenie oznakowanych atomów, promieniotwórczość właściwa oraz procent promieniotwórczości powiązany z zanieczyszczeniami.

Badane gatunki

— nazwa systematyczna, szczep, źródło, wszelkie przypadki wcześniejszych zabiegów, aklimatyzacja, wiek, rozmiar-zakres itp.

Warunki badania

— zastosowana procedura badawcza (np. statyczna, półstatyczna lub przepływowa);

— rodzaj i charakterystyka zastosowanego oświetlenia i fotoperiod(y);

— projekt badania (np. liczba i rozmiar komór badawczych, objętość wody, masa i objętość osadu, tempo wymiany objętości wody (w przypadku procedury przepływowej i półstatycznej), napowietrzanie zastosowane przed badaniem i podczas badania, liczba kontrprób, liczba organizmów w każdej kontrpróbie, liczba badanych stężeń, czas trwania etapów absorpcji i eliminacji, częstotliwość pobierania próbek);

▼M6

— metoda przygotowania i zastosowania badanej substancji, a także uzasadnienie wyboru konkretnej metody;

— badane stężenia nominalne;

— źródło składników sztucznej wody lub osadu lub – w przypadku zastosowania naturalnego środowiska – pochodzenie wody i osadu, opis wszelkich wcześniejszych procesów, jakim została poddana, wyniki wykazania, że zwierzęta użyte do badań posiadają zdolność przeżycia i rozmnażania w zastosowanych środowiskach, charakterystyka osadu (pH, całkowita zawartość amoniaku w wodzie porowej, zawartość całkowitego węgla organicznego, rozkład wielkości cząstek (procent piasku, iłu i gliny), procentowa zawartość wody i wszelkie inne dokonane pomiary) oraz charakterystyka wody (pH, twardość, przewodność właściwa, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziomy chloru resztkowego (jeżeli zostały zmierzone) i wszelkie inne wykonane pomiary);

— nominalna i zmierzona sucha masa w % mokrej masy (lub stosunek suchej masy do mokrej masy) sztucznego osadu; zmierzona sucha masa w % mokrej masy (lub stosunek suchej masy do mokrej masy) w przypadku osadów pobranych w terenie;

— jakość wody wewnątrz komór badawczych scharakteryzowana przez temperaturę, pH, zawartość amoniaku, całkowitą twardość i stężenie rozpuszczonego tlenu;

— szczegółowe informacje na temat traktowania próbek wody, osadu i organizmów, w tym szczegółowe informacje na temat procedur przygotowania, przechowywania, wzbogacania, ekstrakcji oraz procedur analitycznych (i precyzji) zastosowanych w odniesieniu do badanej substancji oraz zawartości lipidów, a także odzysku badanej substancji.

Wyniki

— śmiertelność organizmów kontrolnych i organizmów w każdej komorze badawczej oraz wszelkie zaobserwowane skutki subletalne, w tym nietypowe zachowania (np. unikanie osadu, obecność lub brak obecności odchodów, brak rozmnażania się);

— zmierzona sucha masa w % mokrej masy (lub stosunek suchej masy do mokrej masy) osadu i organizmów użytych do badania (przydatne do normalizacji);

— zawartość lipidów w organizmach;

— krzywe pokazujące kinetykę absorpcji i eliminacji badanej substancji w organizmach, oraz okres konieczny do osiągnięcia stanu ustalonego;

— C_a, C_s i C_w (wraz z odchyleniem standardowym i zakresem, w stosownych przypadkach) dla wszystkich przypadków pobierania próbek (C_a wyrażone jako g na kg^{-1} mokrej i suchej masy całego ciała, a C_s wyrażone jako g na kg^{-1} mokrej i suchej masy osadu i C_w wyrażone w mg na l^{-1}). Jeśli wymagany jest współczynnik akumulacji organizmy żywe-osad (BASF; zob. definicja w dodatku 1) (np. na potrzeby porównania wyników z dwóch lub większej liczby badań przeprowadzonych z wykorzystaniem zwierząt o różnej zawartości lipidów), C_a można dodatkowo wyrazić w g na kg^{-1} zawartości lipidów organizmu, a C_s należy wyrazić w g na kg^{-1} węgla organicznego w osadzie;

— współczynnik bioakumulacji (BAF) (wyrażony w kg mokrego osadu·na kg^{-1} mokrych organizmów), stała tempa absorpcji osadu k_s (wyrażona w g mokrego osadu na kg^{-1} mokrych organizmów d^{-1}) oraz stała tempa eliminacji k_e (wyrażona w d^{-1}); współczynnik BASF (wyrażony w kg zawartości węgla organicznego w osadzie na kg^{-1} zawartości lipidów w organizmach) można dodatkowo przedstawić w sprawozdaniu;

▼**M6**

— niewyeliminowane pozostałości na końcu etapu eliminacji;

— jeżeli zmierzono: procent macierzystej substancji, produktów degradacji oraz związanych substancji resztkowych (tj. procent badanej substancji, która nie może zostać poddana ekstrakcji za pomocą powszechnych metod ekstrakcji) wykryte w glebie i zwierzętach użytych do badania;

— metody statystyczne zastosowane do analizy danych.

Ocena wyników

— zgodność wyników z kryteriami ważności wymienionymi w pkt 21;

— nieoczekiwane lub niestandardowe wyniki, np. niepełna eliminacja badanej substancji ze zwierząt użytych do badania; w takich przypadkach wyniki z dowolnych badań wstępnych mogą dostarczyć przydatnych informacji.

▼M6

Dodatek 1

Definicje i jednostki

Sztuczny osad lub preparowany, odtworzony lub syntetyczny, stanowi mieszaninę materiałów używaną do naśladowania składników fizycznych naturalnego osadu.

Bioakumulacja to wzrost stężenia badanej substancji w organizmie lub na organizmie w stosunku do stężenia badanej substancji w otaczającym środowisku. Bioakumulacja wynika zarówno z procesu biokoncentracji, jak i z procesu biomagnifikacji (zob. poniżej).

Współczynnik bioakumulacji (BAF) w dowolnym momencie etapu absorpcji w trakcie opisanego tu badania bioakumulacji to stężenie badanej substancji w/na organizmie użytym do badania (C_a wyrażone w g·na kg^{-1} mokrej lub suchej masy organizmu) podzielone przez stężenie substancji w otaczającym środowisku (C_s wyrażone jako g·na kg^{-1} mokrej lub suchej masy osadu). Aby odnieść się do jednostek C_a i C_s, jednostką współczynnika bioakumulacji jest kg masy osadu na kg^{-1} masy organizmu (15).

Współczynniki bioakumulacji obliczane bezpośrednio na podstawie stosunku stałej szybkości absorpcji osadu do stałych szybkości eliminacji (k_s oraz k_e, odpowiednio, zob. poniżej) nazywa się kinetycznym współczynnikiem bioakumulacji (BAF_K).

Biokoncentracja to wzrost stężenia badanej substancji w lub na organizmie, wynikający wyłącznie z pobierania substancji przez powierzchnię ciała, w stosunku do stężenia badanej substancji w otaczającym środowisku.

Biomagnifikacja to wzrost stężenia badanej substancji w/na organizmie, wynikający głównie z pobierania zanieczyszczonego pokarmu lub żeru, w stosunku do stężenia badanej substancji w pokarmie lub żerze. Biomagnifikacja może prowadzić do przeniesienia lub akumulacji badanej substancji w ramach sieci pokarmowych.

Współczynnik akumulacji organizmy żywe-osad (BSAF) stanowi stężenie w stanie ustalonym badanej substancji o znormalizowanym poziomie lipidów w/na organizmie użytym do badania, podzielone przez stężenie w stanie ustalonym badanej substancji o znormalizowanym poziomie węgla organicznego w osadzie. C_a w takim przypadku wyraża się w g·na kg^{-1} zawartości lipidów w organizmie, a C_s w g·na kg^{-1} zawartości substancji organicznych w osadzie.

Okres kondycjonowania stosuje się w celu ustabilizowania komponentu mikrobiologicznego osadu i usunięcia np. amoniaku pochodzącego z komponentów osadu; ma miejsce przed wzbogaceniem osadu badaną substancją. Zwykle woda nadosadowa jest odrzucana po kondycjonowaniu.

Eliminacja badanej substancji to strata takiej substancji z tkanki organizmu użytego do badań w drodze czynnych lub biernych procesów, przy czym taka strata zachodzi niezależnie od obecności lub braku badanej substancji w otaczającym środowisku.

Etap eliminacji to okres następujący po przeniesieniu organizmów użytych do badania z zanieczyszczonego środowiska do środowiska niezawierającego badanej substancji, w którym bada się eliminację (lub stratę netto) substancji z badanych organizmów.

Stała szybkości eliminacji (k_e) to wartość liczbowa określająca szybkość zmniejszania się stężenia badanej substancji w/na organizmie użytym do badania, po przeniesieniu organizmów użytych do badania ze środowiska zawierającego badaną substancję do środowiska niezawierającego substancji chemicznych; k_e wyraża się w d^{-1}.

▼M6

Etap ustalania stanu równowagi stosuje się w celu rozprowadzenia badanej substancji między fazę stałą, wodę porową i wodę nadosadową; ma miejsce po wzbogaceniu osadu badaną substancją i przed dodaniem organizmów użytych do badania.

Współczynnik podziału oktanol-woda (K_{ow}) to stosunek rozpuszczalności substancji chemicznej w n-oktanolu i w wodzie w warunkach równowagi, określany czasami także jako współczynnik P_{ow}. Logarytm K_{ow} (log K_{ow}) wykorzystuje się jako wskaźnik zdolności substancji chemicznej do bioakumulacji w organizmach wodnych.

Współczynnik podziału węgiel organiczny-woda (K_{oc}) to stosunek stężenia substancji w/na frakcji węgla organicznego osadu i stężenia substancji chemicznej w wodzie w warunkach równowagi.

Warstwa wody nadosadowej to woda, którą zalano osad w naczyniu badawczym.

Stan równowagi lub **stan ustalony** określa się jako równowagę między procesem absorpcji a procesem eliminacji, które zachodzą równolegle podczas etapu narażenia. Stan ustalony zostaje osiągnięty na wykresie współczynnika bioakumulacji w każdym okresie pobierania próbek względem czasu w momencie, kiedy krzywa staje się równoległa do osi czasu, a trzy następujące po sobie analizy współczynnika bioakumulacji, wykonane na próbkach pobranych w odstępach co najmniej dwóch dni, różnią się od siebie nie więcej niż o 20 % i między trzema okresami pobierania próbek nie ma statystycznie istotnych różnic. W odniesieniu do badanych substancji, które wolno ulegają absorpcji, bardziej odpowiednie będą odstępy czasowe wynoszące siedem dni (5).

Woda porowa to woda wypełniająca przestrzeń między cząstkami osadu lub gleby.

Stała szybkości absorpcji osadu (k_s) stanowi wartość liczbową określającą szybkość wzrostu stężenia badanej substancji w/na organizmie użytym do badania, wynikającego z etapu absorpcji substancji z osadu. k_s wyraża się w g osadu na kg^{-1} organizmu na d^{-1}.

Osad wzbogacony to osad, do którego dodano badaną substancję.

Współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym (BAF_{ss}) to współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym, który nie zmienia się w znaczący sposób przez długi okres czasu, a stężenie badanej substancji w otaczającym środowisku (C_s wyrażane w g na kg^{-1} mokrej lub suchej masy osadu) jest w tym okresie stałe.

Etap absorpcji lub narażenia to okres, w którym organizmy użyte do badań poddaje się narażeniu na działanie badanej substancji.

▼M6

Dodatek 2

Obliczanie parametrów absorpcji i eliminacji

Głównym punktem końcowym badania bioakumulacji jest współczynnik bioakumulacji. Zmierzony współczynnik bioakumulacji można obliczyć poprzez podzielenie stężenia w organizmie użytym do badań, C_a, przez stężenie badanej substancji w osadzie, C_s, w stanie ustalonym. Jeśli podczas etapu absorpcji nie osiągnięto stanu ustalonego, współczynnik bioakumulacji oblicza się w ten sam sposób na dzień 28. Należy jednak zwrócić uwagę, czy współczynnik bioakumulacji jest oparty na stężeniach w stanie ustalonym, czy też nie.

Kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAF_K), stałą szybkości absorpcji osadu (k_s) i stałą szybkości eliminacji (k_e) uzyskuje się zazwyczaj, stosując komputerowe, nieliniowe metody estymacji parametrycznej. Mając szereg czasowy przeciętnych czynników akumulacji (C_a, średnie wartości na każdy dzień pobierania próbek/C_s, średnie wartości dla każdego dnia pobierania próbek = AF) dla etapu absorpcji na podstawie mokrej masy organizmów i osadu, oraz równanie modelowe

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[równanie 1]}$$

w którym AF(t) to stosunek stężenia badanej substancji w organizmach i jej stężenia w osadzie w dowolnym punkcie czasowym (t) etapu absorpcji, wartości BAF_K, k_s i k_e obliczane są za pomocą tych programów komputerowych.

W przypadku osiągnięcia stanu ustalonego podczas etapu absorpcji (tj. $t = \infty$) równanie 1 można zredukować do:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[równanie 2]}$$

gdzie:

k_s = stała szybkości absorpcji w tkance [g osadu na kg^{-1} organizmu]

k_e = stała szybkości eliminacji [d^{-1}]

Stężenie badanej substancji w tkance organizmu w stanie ustalonym ($C_{a,ss}$) oblicza się wtedy za pomocą $k_s/k_e \times C_s$.

Współczynnik akumulacji organizmy żywe-osad można obliczyć w następujący sposób:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

gdzie foc stanowi frakcję węgla organicznego w osadzie, a flip – frakcję lipidów w organizmie, przy czym wartości te należy określić na podstawie albo suchej masy, albo mokrej masy.

Mając czasowy szereg wartości stężenia można modelować kinetykę eliminacji, stosując następujące równania modelu i obliczenia komputerowe w oparciu o nieliniową metodę estymacji parametrycznej.

Średnia zmierzona ilość pozostałości w organizmie na końcu etapu absorpcji jest zalecana jako standardowy punkt początkowy. Wartości modelowane/oszacowane na podstawie etapu absorpcji należy wykorzystać, jeżeli np. zmierzona wartość znacznie odbiega od modelowanej wartości pozostałości w organizmie. Alternatywne wstępne narażenie organizmów wyznaczonych do eliminacji można znaleźć w pkt 50; w przypadku tego podejścia uważa się, że próbki tych wstępnie narażonych organizmów w dniu 0 etapu eliminacji dostarczają realistycznej ilości pozostałości w ciele, aby umożliwić rozpoczęcie kinetyki eliminacji.

▼M6

Jeśli dane pomiarowe wykreślone w funkcji czasu wskazują na stały wykładniczy spadek stężenia badanej substancji w zwierzętach, do opisania przebiegu eliminacji w czasie można zastosować model jednoprzedziałowy (równanie 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[równanie 3]}$$

Procesy eliminacji czasami okazują się dwufazowe, wykazując szybki spadek C_a na wczesnych etapach, który zmienia się w wolniejszą stratę badanych substancji na późniejszych etapach eliminacji (8)(19)(25)). Oba etapy można interpretować, zakładając, że w organizmie istnieją dwa różne przedziały, z których badana substancja jest eliminowana z różną szybkością. W takich przypadkach należy przeanalizować odnośną literaturę, np. (15)(16)(17)(25).

Eliminację z dwóch przedziałów opisuje np. następujące równanie (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[równanie 4]}$$

A i B oznaczają wielkość przedziałów (w procentach całkowitych pozostałości w tkankach), przy czym A to przedział, w którym utrata substancji zachodzi szybko, zaś B to przedział, w którym utrata badanej substancji zachodzi powoli. Suma A i B wynosi 100 % całej objętości przedziału zwierzęcia w stanie ustalonym, k_a i k_b oznaczają odpowiadające im stałe eliminacji [d^{-1}]. Jeżeli model z dwoma przedziałami zostanie dopasowany do danych dotyczących oczyszczania, stałą szybkości absorpcji k_s można wyznaczyć w następujący sposób (53)(54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[równanie 5]}$$

Niemniej jednak takie modelowe równania należy stosować z ostrożnością, zwłaszcza jeśli podczas badania zachodzą zmiany w biodostępności badanej substancji (42).

Zamiast przedstawionych powyżej modelowych równań można obliczyć parametry kinetyczne (k_s i k_e), stosując również model kinetyczny pierwszego rzędu do wszystkich danych z etapu absorpcji i eliminacji łącznie. Opis metody, która pozwala na takie połączone obliczanie stałych tempa absorpcji i eliminacji, można znaleźć w pozycjach bibliografii (55), (56) i (57).

Niewyeliminowane pozostałości należy obliczyć jako dodatkowy punkt końcowy, mnożąc stosunek średniego stężenia w organizmach (C_a) w 10. dniu etapu eliminacji i średniego stężenia w organizmach (C_a) w stanie ustalonym (28. dzień etapu absorpcji) przez 100:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ na końcu eliminacji}(\text{średnie}) \times 100}{C_a \text{ w stanie ustalonym}(\text{średnie})}}$$

▼M6

Dodatek 3

Przykład harmonogramu pobierania próbek w 28-dniowym badaniu bioakumulacji

a) **Etap absorpcji (obejmujący 4-dniowy etap ustalania stanu równowagi)**

Dzień	Czynności
– 6	Przygotowanie zawiesiny torfu na osad; kondycjonowanie zawiesiny przez 48 h;
– 4	wzbogacanie osadu lub części osadu; mieszanie wszystkich składników osadu; usunięcie próbek osadu poddanego działaniu substancji i osadu z próby kontrolnej rozpuszczalnika w celu oznaczenia stężenia badanej substancji; dodanie wody nadosadowej; inkubacja w warunkach badania (etap ustalania stanu równowagi);
– 3-2.	oddzielenie organizmów użytych do badania od hodowli w celu ich aklimatyzacji;
0	pomiar jakości wody (zob. pkt 52); usunięcie kontrprób w celu pobrania próbek wody i osadu na potrzeby ustalenia stężenia badanej substancji; losowe rozmieszczanie organizmów w komorach badawczych; zachowanie wystarczającej liczby podprób organizmów w celu oznaczenia analitycznych wartości tła; kontrola dopływu powietrza, jeżeli stosuje się zamknięty układ badawczy;
1	Usunięcie kontrpróby w celu pobrania próbek; kontrola dopływu powietrza, zachowań organizmów, jakości wody (zob. pkt 56); pobranie próbek wody, osadu i organizmów w celu oznaczenia stężenia badanej substancji;
2	kontrola dopływu powietrza, zachowań organizmów i temperatury;
3	jak w 1. dniu;
4 – 6	jak w 2. dniu;
7	jak w 1. dniu; w razie potrzeby uzupełnić odparowaną wodę;
8 – 13	jak w 2. dniu;
14	jak w 1. dniu; w razie potrzeby uzupełnić odparowaną wodę;
15 – 20	jak w 2. dniu;
21	jak w 1. dniu; w razie potrzeby uzupełnić odparowaną wodę;
22 – 27	jak w 2. dniu;
28	jak w 1. dniu; pomiar jakości wody (zob. pkt 52); koniec etapu absorpcji; zachowanie wystarczającej liczby podprób organizmów na potrzeby określenia analitycznych wartości dotyczących tła, mokrej i suchej masy oraz zawartości lipidów; przeniesienie organizmów z pozostałych kontrprób narażonych na działanie substancji do naczyń zawierających czysty osad w celu przeprowadzenia etapu eliminacji (bez opróżniania przewodu pokarmowego); pobranie próbek wody, osadu i organizmów z prób kontrolnych rozpuszczalnika; pobranie próbek roztworów do pułapek, jeżeli je zainstalowano.
	Czynności wykonywane przed narażeniem (etap osiągania równowagi) należy zaplanować w czasie, uwzględniając właściwości badanej substancji. Jeżeli jest to wymagane, kondycjonowanie przygotowanego osadu poniżej wody nadosadowej w temperaturze 20 ± 2 °C przez 7 dni; w tym przypadku wcześniejsze przygotowanie osadu!
	Czynności opisane dla 2. dnia należy wykonywać codziennie (co najmniej w dni robocze).

▼**M6**

b) **Etap eliminacji**

Dzień	Czynności
– 6	Przygotowanie zawiesiny torfu na osad; kondycjonowanie zawiesiny przez 48 h;
– 4	mieszanie wszystkich składników osadu; usunięcie próbek osadu poddanego działaniu substancji i osadu z próby kontrolnej rozpuszczalnika w celu oznaczenia stężenia badanej substancji; dodanie wody nadosadowej; inkubacja w warunkach badania;
0 (28. dzień etapu absor-pcji)	pomiar jakości wody (zob. pkt 52); należy przenieść organizmy z pozostałych kontrprób narażonych na działanie substancji do naczyń zawierających czysty osad; po **4–6 h** usunięcie kontrprób w celu pobrania próbek wody, osadu i organizmów w celu ustalenia stężenia badanej substancji; losowe rozmieszczanie organizmów w komorach badawczych;
1	Usunięcie kontrpróby w celu pobrania próbek; kontrola dopływu powietrza, zachowań organizmów, jakości wody (zob. pkt 52); pobranie wody, osadu i próbek organizmów w celu oznaczenia stężenia badanej substancji;
2	kontrola dopływu powietrza, zachowań organizmów i temperatury;
3	jak w 1. dniu;
4	jak w 2. dniu;
5	jak w 1. dniu;
6	jak w 2. dniu;
7	jak w 1. dniu; w razie potrzeby uzupełnić odparowaną wodę;
8 – 9	jak w 2. dniu;
10	jak w 1. dniu; koniec etapu eliminacji; pomiar jakości wody (zob. pkt 52); pobranie próbek wody, osadu i organizmów z prób kontrolnych rozpuszczalnika; pobranie próbek roztworów do pułapek, jeżeli je zainstalowano.
	Przygotowanie osadu przed rozpoczęciem etapu eliminacji należy przeprowadzać w taki sam sposób, w jaki miało to miejsce w przypadku etapu absorpcji.
	Czynności opisane dla 2. dnia należy wykonywać codziennie (co najmniej w dni robocze).

▼M6

Dodatek 4

Niektóre własności fizykochemiczne wody nadającej się do rozcieńczania

SKŁADNIK	STĘŻENIA
Cząstki stałe	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 µg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 µg/l
Chlor resztkowy	< 10 µg/l
Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych	< 50 ng/l
Pestycydy chloroorganiczne ogółem plus polichlorowane bifenyle	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l

SKŁAD ZALECANEJ WODY REGENEROWANEJ

a) Roztwór chlorku wapnia

Rozpuścić 11,76 g $CaCl_2 . 2H_2O$ w wodzie dejonizowanej; dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.

b) Roztwór siarczanu magnezu

Rozpuścić 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ w wodzie dejonizowanej; dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.

c) Roztwór wodorowęglanu sodu

Rozpuścić 2,59 g $NaHCO_3$ w wodzie dejonizowanej; dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.

d) Roztwór chlorku potasu

Rozpuścić 0,23 g KCl w wodzie dejonizowanej; dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.

Wszystkie związki chemiczne muszą być przeznaczone do analiz.

Przewodność właściwa wody destylowanej lub dejonizowanej nie powinna przekraczać 10 μScm^{-1}.

Należy wymieszać 25 ml każdego z roztworów od a) do d) i dopełnić całkowitą objętość wodą dejonizowaną do 1 l. Suma jonów wapnia i magnezu w tym roztworze wynosi 2,5 mmol/l.

Stosunek jonów Ca:Mg wynosi 4:1, a jonów Na:K wynosi 10:1. Pojemność kwasowa $K_{S4.3}$ w tym roztworze wynosi 0,8 mmol/l.

Wodę rozcieńczającą należy poddać napowietrzaniu do osiągnięcia nasycenia tlenem, a następnie przechowywać przez około dwa dni bez dalszego napowietrzania przed zastosowaniem.

pH wody nadającej się do rozcieńczania powinno mieścić się w zakresie 6–9.

▼M6

Dodatek 5

Osad sztuczny – zalecenia dotyczące przygotowania i przechowywania

W przeciwieństwie do wymogów zawartych w metodzie badawczej C.8 (40) zaleca się, aby zawartość torfu w sztucznym osadzie wynosiła 2 % zamiast 10 % suchej masy, tak aby odpowiadała niskiej do średniej zawartości organicznych osadów naturalnych (58).

Procentowa zawartość suchych składników sztucznego osadu:

Składnik	Właściwości	% suchego osadu
Torf	Torf sfagnowy, o „średnim” stopniu rozkładu, suszony na powietrzu, bez widocznych pozostałości roślin, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Piasek kwarcowy	Wielkość ziaren: ≤ 2 mm, ale > 50 % cząstek powinna mieścić się w przedziale 50–200 μm	76
Glinka kaolinowa	Zawartość kaolinitu ≥ 30 %	22 ± 1
Źródło pokarmu	*Folia urticae*, sproszkowane liście *Urtica sp*. (pokrzywy zwyczajnej), drobno zmielone (wielkość cząstek ≤ 0,5 mm) lub mieszanina sproszkowanych liści *Urtica sp*. i alfa-celulozy (1:1); zgodna z farmaceutycznymi standardami dotyczącymi spożycia przez ludzi, jako dodatek do suchego osadu	0,4 – 0,5 %
Węglan wapnia	Węglan wapnia $CaCO_3$, sproszkowany, chemicznie czysty, jako dodatek do suchego osadu	0,5 – 1
Woda dejonizowana	Przewodność właściwa ≤ 10 μS/cm, jako dodatek do suchego osadu	30 – 50

Jeżeli przewiduje się podwyższone stężenia amoniaku, np. jeżeli wiadomo, że badana substancja hamuje nitryfikację, użyteczne może być zastąpienie 50 % bogatego w azot sproszkowanej pokrzywy celulozą (np. chemicznie czystym proszkiem z celulozy, wielkość cząstek ≤ 0,5 mm).

Przygotowanie

Torf suszy się na powietrzu i mieli na drobny proszek (wielkość ziaren ≤ 0,5 mm, brak widocznych pozostałości roślin). Zawiesinę wymaganej ilości proszku torfowego przygotowuje się za pomocą wysokosprawnego urządzenia do homogenizacji, dodając porcję dejonizowanej wody do suchego osadu (objętość wody odpowiednia do przygotowania mieszalnego mułu torfowego wynosi 11,5 x suchej masy torfu (8)).

Wartość pH zawiesiny koryguje się do poziomu 5,5 ± 0,5 stosując $CaCO_3$. W celu ustabilizowania pH i komponentu mikrobiologicznego zawiesinę kondycjonuje się przez co najmniej dwa dni w temperaturze 20 ± 2 °C, delikatnie ją mieszając. Wartość pH mierzy się ponownie i koryguje w miarę potrzeby za pomocą $CaCO_3$ do poziomu 6,0 ± 0,5. Następnie całą zawiesinę miesza się z innymi suchymi składnikami, uwzględniając wszystkie części użyte do wzbogacenia. W celu uzyskania jednorodnego osadu dodaje się pozostałą dejonizowaną wodę. Ponownie mierzy się pH i koryguje w miarę potrzeby za pomocą $CaCO_3$ do poziomu 6,5–7,5. Jeżeli jednak przewiduje się powstawanie amoniaku, przydatne może okazać się utrzymywanie pH w osadzie poniżej 7,0 (np. w zakresie 6,0–6,5). Próbki osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość węgla organicznego. Jeżeli przewiduje się powstawanie amoniaku, możliwe jest kondycjonowanie sztucznego osadu przez siedem dni w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania (np. stosunek osad-woda 1: 4, wysokość warstwy osadu jak w naczyniach badawczych) przed wzbogaceniem go badaną substancją, tj. należy uzupełnić go wodą, która powinna zostać napowietrzona. Na koniec okresu kondycjonowania należy usunąć i odrzucić wodę nadosadową. Próbki osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość całkowitego węgla organicznego (np. 3 próbki).

▼M6

Następnie wzbogacony piasek kwarcowy miesza się z osadem na każdym poziomie zabiegu, osad rozdziela się do naczyń badawczych stanowiących kontrpróby i uzupełnia wodą do badania (np. wskaźnik osad-woda 1: 4, wysokość warstwy osadu jak w naczyniach badawczych). Naczynia są następnie inkubowane w takich samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania. W tym momencie rozpoczyna się okres ustalania równowagi. Warstwa wody nadosadowej powinna być napowietrzona.

Wybrane źródło pokarmu należy dodać przed lub w trakcie wzbogacania osadu badaną substancją. Pokarm może zostać zmieszany z zawiesiną torfową (zob. powyżej). Można uniknąć nadmiernego rozkładu źródła pokarmu przed dodaniem organizmów użytych do badania, np. w przypadku długiego okresu ustalania równowagi, poprzez zastosowanie możliwie najkrótszego okresu między dodaniem pokarmu i rozpoczęciem narażenia. W celu zapewnienia wystarczającego kontaktu pokarmu z badaną substancją, źródło pożywienia należy wymieszać z osadem nie później niż w dniu wzbogacenia osadu badaną substancją. Jeżeli długość okresu ustalania równowagi prowadzi do nadmiernej degradacji mikrobiologicznej pokarmu przed dodaniem organizmów użytych do badania, dopuszcza się wyjątki. Próbki osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość całkowitego węgla organicznego (np. 3 próbki wzbogaconego lub kontrolnego osadu).

Suchą masę dodatków (torfu, piasku, kaolinu) należy zapisać w gramach i procentach całkowitej suchej masy.

Należy również zanotować w procentach całkowitej suchej masy objętość wody dodawanej do suchych składników podczas przygotowywania osadu (np. 100 % suchej masy + 46 % wody oznacza, że do 1 000 g suchej masy dodaje się łącznie 460 ml wody, w wyniku czego powstaje 1 460 g mokrego osadu).

Przechowywanie

Suche składniki sztucznego osadu mogą być przechowywane w suchym i chłodnym miejscu w temperaturze pokojowej. Przygotowany, mokry osad może być przechowywany (do późniejszego użytku tylko w hodowli) w temperaturze 4–2 °C bez dostępu światła przez 2–4 tygodni od dnia przygotowania (8).

Osad wzbogacony badaną substancją należy wykorzystać niezwłocznie, chyba że istnieją informacje wskazujące, że dany osad można przechowywać bez wpływu na toksyczność i biodostępność badanej substancji. Próbki wzbogaconego osadu można, do czasu ich analizy, przechowywać w warunkach zalecanych w odniesieniu do danej badanej substancji.

▼M6

Dodatek 6

Gatunki skąposzczetów zalecane do badania bioakumulacji

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

Skąposzczety Tubificidae (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) żyją w osadach wód słodkich w rurkach wypełnionych śluzem. W rurkach tych organizmy zawieszone są głową w dół, zjadając cząstki osadu, wykorzystując przebywające w nim mikroorganizmy i szczątki organiczne. Zazwyczaj tylna część unosi się w warstwie wody nadosadowej, umożliwiając oddychanie. Mimo że gatunek ten zamieszkuje wiele różnych rodzajów osadu na całej półkuli północnej, *Tubifex tubifex* woli osady o stosunkowo drobnym uziarnieniu (59). Przydatność tego gatunku do badań ekotoksykologicznych przedstawiona została na przykład w (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Metody hodowli

Aby zapewnić wystarczającą liczbę *Tubifex tubifex* do przeprowadzania badań bioakumulacji, konieczne jest prowadzenie stałych hodowli laboratoryjnych organizmów. W przypadku hodowli *T. tubifex* (8) zaleca się zastosowanie systemu składającego się ze sztucznego osadu na bazie sztucznej gleby zgodnie z metodą badawczą C.8 (40) oraz z wody regenerowanej zgodnie z metodą badawczą C.1.

Jako naczynia do hodowli wykorzystać można pojemniki wykonane ze szkła lub stali nierdzewnej o wysokości 12–20 cm. Każdy pojemnik z hodowlą wypełnia się warstwą mokrego sztucznego osadu sporządzoną w sposób opisany w dodatku 5. Głębokość warstwy osadu powinna umożliwić organizmom zakopywanie się (głębokość minimum 2 cm w przypadku *T. tubifex*), co jest ich naturalnym zachowaniem. Do systemu dodaje się wodę regenerowaną. Należy dołożyć starań, by zminimalizować naruszenie osadu. Zbiornik z wodą delikatnie napowietrza się (np. 2 pęcherzyki powietrza na sekundę za pomocą powietrza filtrowanego 0,45 μm) przez pipetę Pasteura umieszczoną około 2 cm nad powierzchnią osadu. Zalecana temperatura hodowli wynosi 20 ± 2 °C.

Organizmy dodaje się do systemu hodowli do maksymalnego zagęszczenia 20 000 osobników na m^2 powierzchni osadu. Większe zagęszczenie może spowodować zmniejszenie wzrostu i tempa rozmnażania (43).

W przypadku hodowli w sztucznym osadzie organizmy należy karmić. Dieta składająca się z drobno zmielonego pokarmu dla ryb np. TetraMin® może służyć jako dodatkowy pokarm (8); Klerks 1994, informacje własne. Porcje pokarmu powinny zapewniać wystarczający wzrost i rozmnażanie oraz powinny utrzymywać na minimalnym poziomie odkładanie się amoniaku i wzrost grzybów w hodowli. Pokarm można podawać dwa razy w tygodniu (np. 0,6–0,8 mg na cm^2 powierzchni osadu). Praktyczne doświadczenie pokazało, że zastosowanie pokarmu w formie zawiesiny i poddanego homogenizacji w wodzie dejonizowanej może ułatwić jednorodne rozmieszczenie pożywienia na powierzchni osadu w pojemnikach z hodowlą.

Aby uniknąć odkładania się amoniaku, warstwę wody nadosadowej należy wymieniać, stosując układ przepływowy, lub manualnie, co najmniej raz w tygodniu. W kulturach wyjściowych osad należy wymieniać co trzy miesiące.

Pobieranie organizmów z hodowli można przeprowadzać, przesiewając osad kultury przez sito o wielkości oczek 1 mm, jeżeli potrzebne są tylko osobniki dorosłe. W celu oddzielenia pozostałych kokonów stosuje się sito o wielkości oczek 0,5 mm, a w przypadku młodych organizmów – sito o wielkości oczek 0,25 mm. Sita można umieścić w wodzie regenerowanej po przesianiu przez nie osadu. Organizmy opuszczają sito i mogą następnie być wyjmowane z wody za pomocą delikatnych stalowych pęset lub pipety z krawędziami nadtopionymi nad ogniem.

▼M6

W celu rozpoczęcia badania lub założenia nowej hodowli stosuje się tylko nieuszkodzone i jednoznacznie zidentyfikowane osobniki *Tubifex tubifex* (np. (64)). Chore lub zranione organizmy, jak również kokony zakażone strzępkami grzybni, należy odrzucić.

Zsynchronizowana hodowla może stanowić źródło organizmów w określonym wieku i w odpowiednich odstępach czasu, kiedy zachodzi taka potrzeba. Nowe naczynia z hodowlą zakłada się w wybranych odstępach (np. co dwa tygodnie), rozpoczynając ze zwierzętami w określonym wieku (np. kokony). W opisanych w niniejszym dokumencie warunkach hodowli stosuje się dorosłe organizmy w wieku powyżej 8–10 tygodni. Z hodowli można zbierać osobniki, gdy organizmy złożą nowe kokony, np. po dziesięciu tygodniach. Pobrane dorosłe osobniki można wykorzystać w badaniach, a kokony można wykorzystać do zakładania nowych hodowli.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) również zamieszkują osady słodkich wód na całym świecie i są powszechnie wykorzystywana w badaniach ekotoksykologicznych. Informacje dotyczące biologii, warunków hodowli oraz wrażliwości gatunku przedstawione zostały w (1)(6)(9)(36). *Lumbriculus variegatus* mogą być również hodowane w sztucznym osadzie zalecanym dla *T. tubifex* zgodnie z (8) z pewnymi ograniczeniami. Ponieważ w przyrodzie *L. variegatus* wolą osad o grubszym uziarnieniu niż *T. tubifex* (59), hodowle laboratoryjne ze sztucznym osadem stosowanym w przypadku *T. tubifex* przestają istnieć po 4–6 miesiącach. Praktyczne doświadczenie pokazało, że *L. variegatus* mogą być utrzymywane w piaszczystym podłożu (np. piasek kwarcowy, drobny żwir) w układzie przepływowym, wykorzystując pokarm dla ryb jako źródło pokarmu, przez kilka lat bez odnawiania podłoża. Główną zaletę *L. variegatus* w stosunku do innych gatunków skąposzczetów wodnych stanowi ich szybkie rozmnażanie, prowadzące do szybkiego wzrostu biomasy populacji hodowanych w laboratoriach (1)(6)(9)(10).

Metody hodowli

Warunki hodowli w odniesieniu do *Lumbriculus variegatus* zostały szczegółowo przedstawione w Phipps i in. (1993) (10), Brunson i in. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Poniżej przedstawione zostało krótkie streszczenie tych warunków.

Organizmy można hodować w dużych akwariach (57–80 l), w temperaturze 23 °C z fotoperiodem wynoszącym 16 godzin światła: 8 godzin ciemności (100–1 000 luksów) stosując codziennie odnawianą naturalną wodę (45–50 l na akwarium). Podłoże przygotowuje się poprzez pocięcie niebielonych brązowych papierowych ręczników na paski, które można następnie na kilka sekund wymieszać z wodą do hodowli, aby wytworzyć małe kawałki papierowego podłoża. Podłoże można następnie użyć bezpośrednio w akwariach do hodowli *Lumbriculus*, pokrywając dno zbiornika, lub przechowywać zamrożone w dejonizowanej wodzie do późniejszego wykorzystania. Nowe podłoże w zbiorniku zasadniczo zachowa trwałość przez około dwa miesiące.

Każdą hodowlę rozpoczyna się od 500–1 000 organizmów karmionych 10 ml zawiesiny zawierającej 6 g pokarmu dla młodych pstrągów 3 razy w tygodniu w warunkach wymiany lub przepływu. W przypadku hodowli statycznych lub pół-statycznych dostarczane porcje pokarmu powinny być mniejsze, aby zapobiec rozwojowi bakterii i grzybów. Podłoże składające się z pokarmu i papieru należy przeanalizować pod kątem substancji wykorzystywanych w badaniach bioakumulacji.

W tych warunkach liczba osobników w hodowli zasadniczo ulega podwojeniu w trakcie 10–14 dni.

Lumbriculus variegatus mogą zostać usunięte z hodowli do oddzielnej zlewki, np. przez przesianie podłoża za pomocą siatki o drobnych oczkach lub wyjęcie organizmów za pomocą szklanej pipety o szerokim wylocie (około 5 mm średnicy) z krawędzią nadtopioną nad ogniem. Jeżeli do zlewki zostało również przeniesione podłoże, zlewkę zawierającą organizmy i podłoże pozostawia się na noc w warunkach przepływu, dzięki czemu podłoże zostanie usunięte ze

▼M6

zlewki, natomiast organizmy pozostaną na dnie naczynia. Można je następnie wprowadzić do nowo przygotowanych zbiorników do hodowli lub poddać dalszej obróbce na potrzeby badania jak przedstawiono w (1) i (6). Należy zapobiegać zranieniom lub autotomii organizmów, np. stosując do ich przenoszenia pipety z krawędziami nadtopionymi nad ogniem lub narzędzia ze stali nierdzewnej.

Kwestią, do której należy podejść krytycznie w przypadku zastosowania *L. variegatus* w badaniach bioakumulacji osadu, jest ich sposób rozmnażania (architomia, po której następuje morfalaksja). Wynikiem takiego bezpłciowego rozmnażania są dwa fragmenty, które nie pobierają pokarmu przez pewien okres do momentu regeneracji części głowy lub ogona (np. (36)(37)). Oznacza to, że w przypadku *L. variegatus* pobieranie osadu i zanieczyszczenia z pożywieniem może nie odbywać się w sposób ciągły, jak w przypadku *Tubificidae*, które nie rozmnażają się przez fragmentację.

W związku z tym w celu zminimalizowania niekontrolowanego rozmnażania i odnawiania oraz późniejszej dużej zmienności w wynikach badań, należy dokonać synchronizacji. Zmienność taka może mieć miejsce w przypadku, gdy niektóre osobniki, które uległy fragmentacji i w związku z tym nie pobierają pokarmu przez pewien okres czasu, są w mniejszym stopniu narażone na działanie badanej substancji niż inne osobniki, które nie uległy fragmentacji podczas badania np. (38). Na 10–14 dni przed rozpoczęciem narażenia, organizmy należy sztucznie podzielić (synchronizacja) (65). Należy wykorzystać duże organizmy, które nie wykazują oznak niedawnego podziału. Organizmy te można umieścić na szklanym szkiełku w kropli wody do hodowli i rozciąć w okolicy środkowej części ciała za pomocą skalpela. Należy dopilnować, aby tylne końce były podobnej długości. Tylne końce należy następnie pozostawić w celu odtworzenia nowych głów w naczyniu do hodowli zawierającym to samo podłoże, co wykorzystane w hodowli, i wodę regenerowaną aż do momentu rozpoczęcia narażenia. Oznaką regeneracji nowych głów jest zakopywanie się zsynchronizowanych organizmów w substracie (obecność zregenerowanych głów można potwierdzić, sprawdzając reprezentatywne podróbki pod dwuokularowym mikroskopem). Przewiduje się, że organizmy użyte do badań będą później w podobnym stanie fizjologicznym. Oznacza to, że jeśli podczas badania u zsynchronizowanych organizmów następuje regeneracja przez morfalaksję, praktycznie wszystkie zwierzęta będą w równym stopniu narażone na kontakt ze wzbogaconym osadem. Pierwsze karmienie zsynchronizowanych organizmów powinno zostać wykonane w momencie, gdy organizmy zaczną zakopywać się w podłożu lub 7 dni po rozcięciu. Schemat karmienia powinien wyglądać podobnie jak w przypadku zwykłych hodowli, ale zaleca się karmienie zsynchronizowanych organizmów tym samym pokarmem, które ma być wykorzystane w badaniu. Organizmy należy przechowywać w temperaturze badania wynoszącej 20 ± 2 °C. Po regeneracji w badaniu zastosować należy nienaruszone i kompletne organizmy podobnej wielkości, które pod wpływem delikatnych bodźców mechanicznych aktywnie pływają lub czołgają się. Należy zapobiegać zranieniom lub autotomii organizmów, np. stosując do ich przenoszenia pipety z krawędziami nadtopionymi nad ogniem lub narzędzia ze stali nierdzewnej.

W przypadku zastosowania w badaniu *Lumbriculus variegatus*, ze względu na specyficzny sposób rozmnażania się tego gatunku, powinien nastąpić wzrost liczby organizmów podczas badania, jeżeli warunki są sprzyjające (6). Brak rozmnażania w badaniu bioakumulacji z wykorzystaniem *L. variegatus* należy odnotować i uwzględnić podczas interpretacji wyników badania.

***Branchiura sowerbyi* (Beddard), Tubificidae, Oligochaeta (nie potwierdzone w badaniu międzylaboratoryjnym)**

Branchiura sowerbyi zamieszkują różne rodzaje osadów w zbiornikach, jeziorach, stawach i rzekach, pierwotnie w rejonach tropikalnych. Występują również w zbiornikach z ciepłą wodą półkuli północnej. Liczniej występują jednak w gliniasto-błotnych osadach o wysokiej zawartości związków organicznych.

▼M6

Ponadto organizmy te żyją w warstwie osadu. Nawet tylny koniec organizmów jest zazwyczaj zakopany. Gatunek ten łatwo jest zidentyfikować ze względu na listki skrzelowe znajdujące się w jego tylnej części. Osobniki dorosłe mogą osiągnąć długość 9–11 cm i mokrą masę wynoszącą 40–50 mg. Organizmy te cechują się wysokim wskaźnikiem rozrodczości, czas podwojenia populacji wynosi mniej niż 2 tygodnie w warunkach temperatury i karmienia opisanych poniżej (Aston i in., 1982, (65)). *B. sowerbyi* były stosowane zarówno w badaniach toksyczności, jak i bioakumulacji (odpowiednio Marchese i Brinkhurst 1996 (31), Roghair i in. 1996 (67)).

Metody hodowli

Streszczenie warunków hodowli gatunku *Branchiura sowerbyi* przedstawione zostało poniżej (przedłożone przez Mercedes R. Marchese, INALI, Argentyna i Carla J. Roghair, RIVM, Niderlandy).

Nie jest wymagane stosowanie jednej techniki hodowli organizmów użytych do badania. Organizmy można hodować w niezanieczyszczonym, naturalnym osadzie (31). Doświadczenie pokazuje, że pożywka składająca się z naturalnego osadu i piasku poprawia stan organizmów w porównaniu z czystym naturalnym osadem (32)(67). Do hodowli można użyć 3 zlewki w kształcie litery L, zawierające układ 1 500 ml osadu/wody, składający się z 375 ml naturalnego niezanieczyszczonego osadu (około 10 % całkowitego węgla organicznego; około 17 % cząsteczek ≤ 63 μm), 375 ml czystego piasku (M32) oraz 750 ml regenerowanej i odchlorowanej wody wodociągowej (31)(32)(67). Jako podłoże do hodowli można również wykorzystać papierowe ręczniki, ale wzrost populacji będzie niższy niż w przypadku naturalnego osadu. W układach pół-statycznych warstwę wody w zlewce powoli napowietrza się, a wodę nadosadową należy co tydzień wymieniać.

Na początku każda zlewka zawiera 25 młodych organizmów. Po dwóch miesiącach duże organizmy wyjmuje się z osadu za pomocą pęsety i umieszcza w nowej zlewce ze świeżo sporządzoną pożywką osadu/wody. Stara zlewka zawiera również kokony i młode organizmy. W ten sposób wyhodowanych może zostać do 400 młodych organizmów na zlewkę. Dorosłe osobniki mogą być wykorzystywane do celów reprodukcyjnych przez co najmniej rok.

Temperaturę hodowli należy utrzymywać w przedziale 21–25 °C. Temperatura nie powinna się zmieniać o więcej niż ± 2 °C. Czas konieczny do rozwoju embrionalnego od złożenia jaja do opuszczenia przez młodego osobnika kokonu wynosi w przybliżeniu trzy tygodnie w temperaturze 25 °C. Liczba jaj złożonych przez jednego osobnika gatunku *B. sowerbyi* mieści się w zakresie od 6,36 (31) do 11,2 (30) w mule w temperaturze 25 °C. Liczba jaj przypadających na kokon zawiera się w przedziale 1,8–2,8 (66)(69) lub do 8 (68).

Raz w tygodniu należy mierzyć stężenie rozpuszczonego tlenu, twardość wody, temperaturę i pH. Dwa lub trzy razy w tygodniu można dodać do osadu *ad libitum* pokarm dla ryb (np. TetraMin®). Organizmy można również karmić *ad libitum* rozmrożoną sałatą.

Główną zaletą tego gatunku jest wysoka indywidualna biomasa (do 40–50 mg mokrej masy na osobnika). W związku z tym gatunek ten może być wykorzystywany w badaniu bioakumulacji badanych substancji nieoznakowanych izotopowo. Może on zostać narażony w układach wykorzystywanych w przypadku *T. tubifex* lub *L. variegatus* z jednym osobnikiem na każdą kontrpróbę (11). Następnie należy jednak zwiększyć liczbę kontrprób, chyba że stosowane są większe komory badawcze (11). Należy również dostosować do tych gatunków kryterium ważności powiązane z zakopywaniem się.

▼**M6**

BIBLIOGRAFIA

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. W: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Tom 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(2) Komisja Europejska (WE) (2003). Wskazówki techniczne w sprawie oceny ryzyka uzupełniające dyrektywę Komisji 93/67/EWG w sprawie oceny ryzyka ze strony substancji notyfikowanych, rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94 w sprawie oceny ryzyka stwarzanego przez istniejące substancje oraz dyrektywę 98/8/WE Parlamentu Europejskiego i Rady dotyczącą wprowadzania do obrotu produktów biobójczych; część I–IV. Urząd Publikacji Wspólnot Europejskich (Komisja Europejska), Luksemburg.

(3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. Monografie OECD nr 60. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD), Paryż.

(4) Ingersoll C.G., G.T. Ankley, D.A. Benoit, E.L. Brunson, G.A. Burton, F.J. Dwyer, R.A. Hoke, P. F. Landrum, T. J. Norberg-King i P.V. Winger. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(5) Rozdział C.13 niniejszego załącznika. Biokoncentracja: badanie ryb w warunkach przepływu.

(6) Stany Zjednoczone EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Wyd. drugie. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marzec 2000.

(7) Rozdział C.27 niniejszego załącznika: Badanie toksyczności w układzie osad-woda na ochotkowatych z wykorzystaniem wzbogaconego osadu.

(8) 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.

(9) Ingersoll C.G., E.L. Brunson, N. Wang, F.J. Dwyer, G.T. Ankley, D.R. Mount, J. Huckins, J. Petty i P. F. Landrum (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. 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.

(11) Egeler Ph., J. Römbke, Th. Knacker, C. Franke i G. Studinger (1999). Warsztaty pt. „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes”, 26–27.4.1999, Hochheim/Main, Niemcy. Sprawozdanie dotyczące projektu raportu na temat badań i rozwoju nr 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Egeler Ph., M. Meller, H.J. Schallnaß i D. Gilberg (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. i Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301–310.

▼**M6**

(14) Nendza M. (1991). QSAR bioakumulacji: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. W: R. Nagel i R. Loskill (red.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Materiały z międzynarodowych warsztatów, Berlin 1990. VCH, Weinheim.

(15) Landrum P.F., H. Lee II i M.J. Lydy (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. i Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. i Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.

(18) Kukkonen, J. i Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(19) Franke C., G. Studinger, G. Berger, S. Böhling, U. Bruckmann, D. Cohors-Fresenborg i U. Jöhncke (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.

(20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 23.

(21) Stany Zjednoczone EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

(22) Następujące rozdziały niniejszego załącznika:

Rozdział A.4, Prężność par

Rozdział A.5, Napięcie powierzchniowe

Rozdział A.6, Rozpuszczalność w wodzie

Rozdział A.8, Współczynnik podziału, metoda wytrząsania w kolbie

Rozdział A.24, Współczynnik podziału, wysokosprawna chromatografia cieczowa

Rozdział C.7, Degradacja — degradacja abiotyczna: hydroliza jako funkcja pH

Rozdział C.4 A-F, Oznaczanie szybkiej biodegradowalności

Rozdział C.19, Oszacowanie współczynnika adsorpcji (K_{oc}) na glebie i w osadzie ściekowym przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Rozdział C.29, Szybka biodegradowalność CO_2 w szczelnie zamkniętych naczyniach

(23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Wytyczne na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny substancji chemicznych, nr 3, OECD, Paryż. OECD, Paryż.

(24) Antoine M.D., S. Dewanathan i G. Patonay (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 i G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. W: Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (red. tomu: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(26) Spacie A. i J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(27) Hawker, D.W. i Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22, 701-707.

(28) 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.

(29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. i Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061-1072.

(30) Aston R.J. i 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. i R.O. i 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. i Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. Sprawozdanie RIVM 719102027.

(33) Rozdział C.1 niniejszego załącznika, Ryby, badanie toksyczności ostrej.

(34) OECD (1992c). Wytyczne dotyczące badania substancji chemicznych nr 210. Badanie toksyczności na wczesnych etapach życia ryb. OECD, Paryż.

(35) Kaster J.L., J.V. Klump, J. Meyer, J. Krezoski i M.E. Smith (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(36) Leppänen, M.T. i Kukkonen, J.V.K. Kukkonen 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(37) Leppänen, M.T. i Kukkonen, J.V.K. Kukkonen 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. 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.

(39) 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.

▼**M6**

(40) Rozdział C.8 niniejszego załącznika, Toksyczność dla dżdżownic.

(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). W: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (red.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175–184. Plenum Press, Nowy York.

(44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów, E 1391–94.

(45) Hooftman R.N., K. van de Guchte i C.J. Roghair (1993). (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. 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.

(48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. i 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. i Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30, 1 099–1 105.

(50) Bligh, E.G. i Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

(51) De Boer J., F. Smedes, D. Wells i A. Allan (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. Unijny program norm, pomiarów i badań.

(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. Instytut ds. Jakości Wód, Dania.

(53) Zok S., G. Görge, W. Kalsch, i R. Nagel (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. Praca habilitacyjna, Uniwersytet Jana Gutenberga, Moguncja, Niemcy.

(55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries i 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. i N.M. Van Straalen (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. i 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., M.A. Farrell i R.O. Brinkhurst (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47–67.

(62) Chapman P.M., M.A. Farrell i R.O. Brinkhurst (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69-78.

(63) Rodriguez, P. i Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. W: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): 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., M. Meller, H.J. Schallnaß i D. Gilberg (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. We współpracy z R. Nagel i B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(66) Aston, R.J., Sadler, K. i 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. i 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. Sprawozdanie RIVM 719101026.

(68) Aston R.J. (1984). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89-94.

(69) Bonacina C., A. Pasteris, G. Bonomi i D. Marzuoli (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267–274.

▼M7

C.47. BADANIE TOKSYCZNEGO WPŁYWU SUBSTANCJI NA RYBY WE WCZESNYCH STADIACH ROZWOJU

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 210 (2013). Celem badań prowadzonych na rybach we wczesnych stadiach rozwoju jest określenie letalnego i subletalnego wpływu substancji chemicznych na badanych stadiach rozwoju i na badane gatunki. Badania pozwalają na uzyskanie informacji istotnych do celów oszacowania długoterminowego letalnego i subletalnego wpływu substancji chemicznej na inne gatunki ryb.

2. Dotycząca badań wytyczna nr 210 opiera się na wniosku Zjednoczonego Królestwa, który omówiono na posiedzeniu ekspertów OECD zorganizowanym w Medmenham (Zjednoczone Królestwo) w listopadzie 1988 r. i uaktualniono w 2013 r. celem odzwierciedlenia doświadczenia zdobytego podczas wykonywania tego badania i zaleceń z warsztatów OECD dotyczących badania toksyczności na rybach, które to warsztaty odbyły się we wrześniu 2010 r. (1).

ZASADA BADANIA

3. Ryby we wczesnych stadiach rozwoju poddaje się narażeniu na działanie zakresu stężeń badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w wodzie. Preferowane są warunki przepływowe; jeżeli jednak ich zapewnienie jest niemożliwe, dopuszczalne jest zastosowanie warunków półstatycznych. W celu uzyskania szczegółowych informacji należy zapoznać się z wytyczną OECD „Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures” (2). Badanie rozpoczyna się od umieszczenia zapłodnionych jaj w komorach badawczych i kontynuuje się je przez okres specyficzny dla danego gatunku potrzebny do osiągnięcia stadium młodocianego przez ryby kontrolne. Dokonuje się oceny letalnego i subletalnego wpływu i porównuje się go z wartościami kontrolnymi w celu określenia najniższego stężenia, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), aby ustalić (i) najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub (ii) ECx (np. EC10, EC20), stosując model regresji do oszacowania stężenia, które spowoduje zmianę mierzonego wpływu o x %. Zgłoszenie odpowiednich stężeń efektywnych i parametrów może zależeć od ram regulacyjnych. Badane stężenia powinny zawierać w swoim zakresie ECx, tak aby ECx wynikało raczej z interpolacji niż ekstrapolacji (definicje znajdują się w dodatku 1).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

4. Badana substancja chemiczna oznacza substancję będącą przedmiotem badania. Rozpuszczalność w wodzie (zob. rozdział A.6 niniejszego załącznika) i prężność par (zob. rozdział A.4 niniejszego załącznika) badanej substancji chemicznej powinna być znana, przy czym należy przyjąć wiarygodną metodę analityczną wykorzystywaną do oznaczania ilościowego zawartości substancji chemicznej w roztworach do badań o znanej i udokumentowanej dokładności i granicy oznaczalności. Chociaż wyniki badania ostrej toksyczności (zob. rozdziały C.1 lub C.49 niniejszego załącznika) nie są niezbędne do przeprowadzenia przedmiotowego badania, mogą one dostarczyć użytecznych informacji, zwłaszcza gdy zostały przeprowadzone na gatunku wybranym do tego badania.

5. Jeżeli daną metodę badawczą stosuje się do badania mieszaniny, należy w miarę możliwości jak najdokładniej scharakteryzować skład tej mieszaniny, np. podając nazwę chemiczną jej składników, ich ilości oraz właściwości specyficzne dla poszczególnych substancji (podobnie jak właściwości wspomniane powyżej). Przed zastosowaniem metody badawczej w badaniu regulacyjnym mieszaniny należy zastanowić się nad tym, czy wyniki uzyskane w wyniku jej stosowania będą możliwe do zaakceptowania w odniesieniu do założonego celu regulacyjnego.

6. Użyteczne informacje obejmują wzór strukturalny, czystość substancji, rozpuszczalność w wodzie, stabilność w wodzie i przy narażeniu na działanie światła, pK_a, P_{ow}, a także wyniki badania szybkiej biodegradowalności (np. rozdziały C.4 lub C.29 niniejszego załącznika).

▼M7

WAŻNOŚĆ BADANIA

7. Aby badanie było ważne, spełnione muszą być następujące warunki:

— stężenie rozpuszczonego tlenu powinno wynosić > 60 % wartości nasycenia powietrzem przez cały czas trwania badania;

— różnica temperatury wody między komorami badawczymi lub kolejnymi dniami w dowolnym momencie w czasie trwania badania nie powinna przekraczać ± 1,5 °C, a jej wartość należy utrzymywać w zakresie temperatur określonym dla danego gatunku doświadczalnego (dodatek 2);

— pomiar analityczny badanych stężeń jest obowiązkowy;

— ogólny wskaźnik przeżywalności zapłodnionych jaj i wskaźnik przeżywalności po wylęgu w próbach kontrolnych i, w stosownych przypadkach, w kontrolach z rozpuszczalnikiem powinien być większy niż wartości graniczne określone w dodatku 2 lub im równy.

8. Jeżeli zaobserwowane zostanie niewielkie odchylenie od kryteriów ważności, należy rozważyć konsekwencje dla wiarygodności danych z badania i należy uwzględnić takie rozważania w sprawozdaniu. Należy zgłosić i omówić wpływ na przeżywalność, wylęg lub wzrost w kontroli z rozpuszczalnikiem w porównaniu z kontrolną ujemną w kontekście wiarygodności danych z badania.

OPIS METODY

Komory badawcze

9. W badaniu można użyć dowolnych naczyń wykonanych ze szkła, stali nierdzewnej lub z innych chemicznie obojętnych materiałów. Ponieważ wiadomo, że silikon wykazuje wysoką zdolność do absorbowania substancji lipofilowych, należy zminimalizować wykorzystanie rur silikonowych w badaniach przepływowych i wykorzystanie uszczelek silikonowych mających kontakt z wodą i zastąpić je np. akwariami wykonanymi z jednego bloku szkła. Naczynia powinny być dostatecznie duże, aby umożliwić odpowiedni wzrost w próbie kontrolnej, utrzymanie stężenia rozpuszczonego tlenu (np. w przypadku małych gatunków ryb wystarczające będzie akwarium o objętości 7 l) oraz spełnienie kryteriów dotyczących wskaźnika obciążenia określonych w pkt 19. Zaleca się losowe rozmieszczenie komór badawczych w obszarze badania. Układ bloków losowanych, w ramach którego w każdym bloku następuje każde podanie substancji chemicznej, jest korzystniejszy niż układ całkowicie zrandomizowany. Komory badawcze powinny być zabezpieczone przed niepożądanymi zakłóceniami. Przed wprowadzeniem organizmów doświadczalnych zaleca się kondycjonowanie układu badawczego ze stężeniami badanej substancji chemicznej przez okres konieczny do wykazania stabilnych stężeń ekspozycyjnych.

Wybór gatunku

10. Zalecane gatunki ryb wymieniono w tabeli 1. Nie wyklucza to możliwości stosowania innych gatunków, lecz może się to wiązać z koniecznością dostosowania procedury badawczej w celu zapewnienia odpowiednich warunków badania. W takim przypadku należy podać uzasadnienie wyboru gatunku i metody doświadczalnej.

Utrzymywanie tarlaków

11. Szczegółowe informacje dotyczące utrzymywania tarlaków w zadowalających warunkach można znaleźć w dodatku 3 i w pozycjach (3)(4)(5) bibliografii.

Postępowanie z zapłodnionymi jajami, embrionami i larwami

12. Początkowo zapłodnione jaja, embriony i larwy można poddawać narażeniu w obrębie naczynia głównego w mniejszych naczyniach wykonanych ze szkła lub stali nierdzewnej, których ściany lub podstawy są wykonane z siatki w celu umożliwienia przepływu roztworu do badań przez naczynie. Nieburzliwy przepływ w tych małych naczyniach można wywołać przez zawieszenie

▼M7

ich na wysięgniku przemieszczającym naczynie w górę i w dół, przy czym organizmy powinny być zawsze zanurzone. Zapłodnione jaja ryb łososiowatych można umieścić na statywach lub siatkach, których szczeliny są wystarczająco duże, aby larwy mogły przez nie spadać po wylęgu.

13. Jeżeli w głównym naczyniu badawczym wykorzystywano pojemniki, kratki lub siatki na jaja do umocowania jaj, elementy te należy usunąć po wylęgu larw, zgodnie z wytycznymi w dodatku 3; należy jednak zachować siatki, aby uniemożliwić larwom ucieczkę. Jeśli zachodzi konieczność przeniesienia larw, nie można ich narażać na działanie powietrza i nie wolno używać siatek do wypuszczania larw z pojemników na jaja. Moment takiego przeniesienia jest różny w zależności od gatunku; przy czym fakt ten należy udokumentować w sprawozdaniu. Przeniesienie nie zawsze jest jednak konieczne.

Woda

14. Każda woda, w której gatunki doświadczalne wykazują odpowiednie długoterminowe przeżycie i wzrost, może być stosowana jako woda użyta do badania (dodatek 4). Powinna mieć ona stałą jakość w okresie trwania badania. Aby mieć pewność, że woda rozcieńczająca nie będzie wpływała zbytnio na wyniki badania (np. na skutek kompleksowania badanej substancji chemicznej) lub nie będzie wywierać szkodliwego wpływu na parametry tarlaków, należy co pewien czas pobierać próbki do analizy. Jeżeli wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, należy np. co dwa miesiące dokonywać pomiaru zawartości metali ciężkich (np. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} i $SO4^{2-}$), amoniaku, całkowitego chloru resztkowego, pestycydów, całkowitego węgla organicznego i zawiesiny. Jeżeli wiadomo, że jakość wody jest zmienna, pomiary należy przeprowadzać częściej; częstotliwość przeprowadzania pomiarów zależy od tego, jak bardzo zmienna jest jakość wody. Niektóre właściwości chemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej wymieniono w dodatku 4.

Roztwory do badań

15. W przypadku badań przepływowych wymagany jest system, który nieprzerwanie dozuje i rozcieńcza roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej (np. pompa dozująca, rozcieńczalnik proporcjonalny, sytnik) w celu doprowadzenia serii stężeń do komór badawczych. W trakcie badania należy okresowo sprawdzać natężenia przepływu roztworów podstawowych i wody rozcieńczającej, które przez cały czas trwania badania nie powinny różnić się o więcej niż 10 %. Za odpowiednie uznano natężenie przepływu równe co najmniej pięciu objętościom komory badawczej w ciągu 24 godzin (3). Jeżeli jednak przestrzegana jest wartość wskaźnika obciążenia wskazana w pkt 19, możliwe jest zastosowanie mniejszego natężenia przepływu, np. wynoszącego 2–3 objętości komór badawczych, w celu uniknięcia szybkiego usunięcia paszy.

16. Roztwory do badań o wybranych stężeniach przygotowuje się przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Roztwór podstawowy najlepiej jest przygotowywać poprzez mechaniczne mieszanie lub wstrząsanie badanej substancji chemicznej z wodą rozcieńczającą (np. poprzez mieszanie lub sonikację). Można zastosować kolumny nasyceniowe (rozpuszczające) lub metody pasywnego dawkowania (6) w celu uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Nie zaleca się stosowania nośnika rozpuszczalnikowego. W przypadku gdy rozpuszczalnik jest niezbędny, należy równolegle przeprowadzić próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem przy takim samym stężeniu rozpuszczalnika jak przy podaniach substancji chemicznej; tj. poziom rozpuszczalnika powinien być w miarę możliwości równy we wszystkich stężeniach oraz w kontroli z rozpuszczalnikiem. W przypadku niektórych układów z rozcieńczalnikiem może być to trudne z technicznego-punktu widzenia; w takim przypadku stężenie rozpuszczalnika w kontroli z rozpuszczalnikiem powinno być równe najwyższemu stężeniu rozpuszczalnika w grupie badanej. W odniesieniu do substancji trudnych do zbadania

▼M7

należy zapoznać się z wytyczną OECD dotyczącą badania toksyczności wodnej trudnych substancji i mieszanin (Guidance Document No. 23 on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures) (2). W przypadku stosowania rozpuszczalnika wybór rozpuszczalnika będzie uwarunkowany właściwościami chemicznymi substancji. W wytycznej OECD nr 23 zaleca się, by maksymalne stężenie wynosiło 100 µl/l. W celu uniknięcia potencjalnego wpływu rozpuszczalnika na mierzone punkty końcowe (7) zaleca się utrzymywanie stężenia rozpuszczalnika na jak najniższym poziomie.

17. W badaniu półstatycznym można postępować zgodnie z dwoma różnymi procedurami wymiany. W czystych naczyniach przygotowuje się nowe roztwory do badań i do nowych naczyń ostrożnie przenosi się jaja i larwy, które przeżyły albo organizmy doświadczalne pozostawia się w naczyniach badawczych i wymienia się część (co najmniej dwie trzecie) objętości roztworu do badań / substancji kontrolnej.

PROCEDURA

Warunki narażenia na działanie substancji

Czas trwania

18. Badanie należy rozpocząć najwcześniej jak to możliwe po zapłodnieniu jaj, przy czym najlepiej zanurzyć je w roztworach do badań przed rozpoczęciem bruzdkowania tarczy zarodkowej lub jak najszybciej po tym stadium. Czas trwania badania będzie zależy od wykorzystanego gatunku. W dodatku 2 przedstawiono niektóre zalecane czasy trwania badania.

Obciążenie

19. Liczba zapłodnionych jaj na początku badania musi być wystarczająca do spełnienia wymogów statystycznych. Należy je rozdzielić w taki sposób, by zostały poddane działaniu substancji chemicznej w sposób losowy, przy czym w każdym stężeniu należy wykorzystać co najmniej 80 jaj, rozdzielonych równo między co najmniej cztery komory badawcze będące kontrpróbami. Wskaźnik obciążenia (biomasa w przeliczeniu na objętość roztworu do badań) powinien być wystarczająco niski, by w stadium jaja i w stadium larwalnym możliwe było utrzymanie stężenia rozpuszczonego tlenu wynoszącego co najmniej 60 % wartości nasycenia powietrzem bez napowietrzania. Zaleca się, by wskaźnik obciążenia w badaniach przepływowych nie przekraczał 0,5 g/l mokrej masy na 24 godziny i by nie przekraczał 5 g/l roztworu w dowolnym momencie (3).

Światło i temperatura

20. Fotoperiod i temperatura wody powinny być odpowiednie dla gatunku doświadczalnego (zob. dodatek 2).

Karmienie

21. Pasza i karmienie są kluczowe, przy czym zasadnicze jest rozpoczęcie podawania paszy odpowiedniej dla każdego stadium życia w odpowiednim czasie i w ilości wystarczającej do utrzymania prawidłowego wzrostu. Wszystkie kontrpróby powinny otrzymywać w przybliżeniu takie same ilości paszy, chyba że zostały one dostosowane w celu uwzględnienia upadkowości. Aby zapobiec akumulacji odpadów, należy usuwać nadwyżkę paszy i ekskrementy. Szczegółowy opis schematów karmienia znajduje się w dodatku 3, lecz w miarę zdobywania doświadczenia schematy żywienia są stale udoskonalane, by poprawić przeżywalność i zoptymalizować wzrost. Pasza żywa stanowi źródło urozmaicenia warunków bytowania i w związku z tym należy stosować ją zamiast paszy suchej lub mrożonej lub jako dodatek do takiej paszy, gdy tylko jest ona odpowiednia dla danego gatunku i stadium rozwoju.

Badane stężenia

22. Zwykle wymagane jest zastosowanie pięciu stężeń badanej substancji chemicznej, z co najmniej czterema kontrpróbami na stężenie, które różnią się o taką samą wielokrotność nieprzekraczającą 3,2. Podczas wyboru badanych stężeń należy uwzględnić informacje dotyczące badania ostrej toksyczności, najlepiej z wykorzystaniem tego samego gatunku lub badania ustalającego zakres (1), jeżeli tylko takie informacje są dostępne. Podczas wyboru

▼M7

zakresu badanych stężeń należy jednak wziąć pod uwagę wszystkie źródła informacji, w tym takie źródła, jak np. podejście przekrojowe lub dane z badania ostrej toksyczności na rybim embrionie. Jeżeli celem badania jest jedynie ustanowienie empirycznego NOEC, dopuszczalne jest przeprowadzenie badania granicznego lub rozszerzonego badania granicznego, w którym występuje mniej niż pięć stężeń, jako badania ostatecznego. Jeżeli użyto mniej niż pięć stężeń, należy podać uzasadnienie. Nie ma potrzeby przeprowadzania badania, gdy stężenia badanej substancji chemicznej są wyższe niż 96-godzinne LC_{50} lub 10 mg/l, którakolwiek z tych wartości jest niższa.

Kontrole

23. Próba kontrolna z wodą rozcieńczającą i, w miarę potrzeby, kontrola z rozpuszczalnikiem zawierające nośnik rozpuszczalnikowy powinny być przeprowadzane wyłącznie jako dodatek do badania z wykorzystaniem serii stężeń badanej substancji chemicznej (zob. pkt 16).

Częstotliwość oznaczeń i pomiarów analitycznych

24. Przed rozpoczęciem okresu narażenia należy zapewnić (np. poprzez dokonanie pomiaru badanych stężeń) prawidłowe działanie układu podawania substancji chemicznej we wszystkich kontrpróbach. Należy ustalić wymagane metody analityczne, w tym odpowiednią granicę oznaczalności i dostateczną wiedzę na temat stabilności substancji w układzie badawczym. W trakcie badania stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w regularnych odstępach czasu w celu scharakteryzowania narażenia. Konieczne jest wykonanie co najmniej pięciu oznaczeń. W przypadku układów przepływowych pomiary analityczne badanej substancji chemicznej w jednej kontrpróbie na stężenie należy wykonywać co najmniej raz w tygodniu, systematycznie zmieniając kontrpróby. Dodatkowe oznaczenia analityczne często będą miały korzystny wpływ na podniesienie jakości wyniku badania. Próbki mogą wymagać przefiltrowania w celu usunięcia ewentualnych cząstek stałych (np. przez filtr z porami o średnicy 0,45 μm) lub odwirowania, aby mieć pewność, że oznaczenia substancji chemicznej są wykonywane w rzeczywistym roztworze. Aby obniżyć adsorpcję badanej substancji chemicznej, należy nasączyć filtry przed ich użyciem. Jeżeli zmierzone stężenie nie utrzymuje się w granicach 80–120 % stężenia nominalnego, należy oznaczyć stężenia efektywne i wyrazić względem średniej arytmetycznej stężenia w badaniach przepływowych (zob. dodatek 6 metody badawczej C.20 w odniesieniu do obliczania średniej arytmetycznej(8)) i wyrazić względem średniej geometrycznej zmierzonych stężeń w przypadku badań półstatycznych (zob. rozdział 5 wytycznej OECD „Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures” (2)).

25. W trakcie badania należy dokonywać pomiarów rozpuszczonego tlenu, pH i temperatury we wszystkich naczyniach badawczych, a co najmniej raz w tygodniu należy mierzyć zasolenie i twardość, jeżeli jest to uzasadnione, na początku i pod koniec badania. Zalecane jest stałe monitorowanie temperatury w co najmniej jednym naczyniu badawczym.

Obserwacje

26. **Stadium rozwoju embrionalnego**: należy jak najdokładniej sprawdzić etap embrionalny na początku narażenia na działanie badanej substancji chemicznej. Można tego dokonać, stosując reprezentatywną próbkę jaj odpowiednio utrwalonych i oczyszczonych.

27. **Wylęg i przeżywalność**: obserwacje wylęgania i przeżywalności należy prowadzić co najmniej raz dziennie, a wartości liczbowe należy odnotowywać. W przypadku zaobserwowania pojawienia się grzyba we wczesnym stadium rozwoju embrionalnego (np. w pierwszym lub drugim dniu badania), należy takie jaja policzyć i usunąć. Martwe embriony, larwy i ryby młode należy usunąć bezzwłocznie po ich zauważeniu, ponieważ mogą szybko ulec rozkładowi i rozdrobnieniu w wyniku działalności pozostałych ryb. Należy zachować najwyższą ostrożność przy usuwaniu martwych osobników, aby nie uszkodzić fizycznie znajdujących się w pobliżu jaj/larw. Oznaki śmierci różnią się w zależności od gatunku i stadium rozwoju: Na przykład:

▼M7

— w przypadku zapłodnionych jaj: w szczególności we wczesnych stadiach znacząca utrata przezroczystości i zmiana w zabarwieniu spowodowane koagulacją lub strącaniem białek, przez co jaja stają się białe i nieprzezroczyste;

— w przypadku embrionów, larw i ryb młodych: bezruch lub brak ruchu oddechowego lub brak bicia serca lub brak reakcji na bodźce mechaniczne.

28. **Nietypowy wygląd**: należy odnotowywać liczbę larw lub ryb młodych o nieprawidłowym wyglądzie ciała w regularnych odstępach czasu, w zależności od czasu trwania badania, podając opis charakteru anomalii. Należy zwrócić uwagę, że larwy i ryby młode z anomaliami są zjawiskiem naturalnym i w próbach kontrolnych niektórych gatunków ich odsetek może być rzędu kilku procent. Jeżeli deformacje i związane z tym nietypowe zachowanie zostaną uznane za tak poważne, że sprawiają organizmowi duże cierpienie, oraz jeżeli organizm osiągnął punkt, po przekroczeniu którego powrót do zdrowia nie będzie możliwy, można taki organizm wyeliminować z badania. Zwierzęta takie należy uśmiercić i potraktować jako przypadki upadkowości dla potrzeb późniejszej analizy danych. Normalny rozwój embrionalny został udokumentowany w odniesieniu do większości gatunków zalecanych do wykorzystywania w niniejszej metodzie badawczej (9) (10) (11) (12).

29. **Nietypowe zachowanie**: należy odnotowywać anomalie, np. hiperwentylacja, nieskoordynowane ruchy w czasie pływania, nietypowy spokój i nietypowe zachowanie podczas pobierania pokarmu, w regularnych odstępach czasu w zależności od czasu trwania badania (np. raz dziennie w przypadku gatunków ciepłowodnych). Powyższe objawy, które trudno jednak ocenić ilościowo, mogą, w przypadku ich zaobserwowania, pomóc w interpretacji danych dotyczących upadkowości.

30. **Masa**: pod koniec badania wszystkie ryby, które przeżyły, są ważone co najmniej na podstawie kontrpróby (zgłoszenie liczby zwierząt w kontrpróbie i średniej masy zwierzęcia): preferowana jest mokra masa (po osuszeniu bibułą), można jednak zgłaszać również dane dotyczące suchej masy (13).

31. **Długość ciała**: pod koniec badania mierzy się długość ciała poszczególnych osobników. Zaleca się podawać długość całkowitą, jeżeli jednak ma miejsce martwica lub uszkodzenia płetwy ogonowej, można stosować długość standardową. W stosunku do wszystkich ryb wykorzystanych w badaniu należy stosować taką samą metodę. Długość ciała poszczególnych osobników można mierzyć za pomocą np. suwmiarki, kamery cyfrowej lub wzorcowanego mikrometru okularowego. Typowe minimalne długości ciała zostały zdefiniowane w dodatku 2.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

32. Zaleca się, aby plan doświadczenia i wybrany test statystyczny zapewniły dostateczną moc (80 % lub wyższą) do wykrycia zmian o znaczeniu biologicznym w punktach końcowych, w przypadku gdy należy zgłosić NOEC. Zgłoszenie odpowiednich stężeń efektywnych i parametrów może zależeć od ram regulacyjnych. Jeżeli należy zgłosić EC_x, układ doświadczalny i wybrany model regresji powinny umożliwiać oszacowanie EC_x, tak aby (i) 95-procentowy przedział ufności podany w odniesieniu do EC_x nie zawierał zera i nie był zbyt szeroki, (ii) 95-procentowy przedział ufności w odniesieniu do prognozowanej średniej przy EC_x nie zawierał średniej kontrolnej, (iii) nie istniało znaczące niedopasowanie modelu regresji do danych. Każde z tych podejść wymaga ustalenia procentowej zmiany w każdym punkcie końcowym, który jest ważny pod względem wykrycia lub oszacowania. Układ doświadczalny należy tak dostosować, aby to umożliwiał. Jeżeli nie zostaną

▼M7

spełnione powyższe warunki oznaczenia EC_x, należy zastosować podejście oparte na NOEC. Istnieje małe prawdopodobieństwo, aby do wszystkich punktów końcowych miała zastosowanie taka sama zmiana procentowa, i równie mało prawdopodobne jest, aby można było zaplanować wykonalne doświadczenie spełniające te kryteria dla wszystkich punktów końcowych, w związku z tym należy skupić się na tych punktach końcowych, które są istotne dla danego doświadczenia, planując doświadczenie w odpowiedni sposób. W dodatkach 5 i 6 można znaleźć schematy statystyczne i wytyczne dotyczące każdego podejścia, które można wykorzystać przy przetwarzaniu danych i wyborze najodpowiedniejszego testu lub modelu statystycznego. Można również zastosować inne podejścia statystyczne, pod warunkiem że są one uzasadnione z naukowego punktu widzenia.

33. Konieczna będzie analiza zmian w obrębie każdego zbioru kontrprób z zastosowaniem analizy wariancji lub procedur tablicy wielodzielczej oraz odpowiednich metod analizy statystycznej opartych na tej analizie. W celu dokonania porównania wielokrotnego wyników uzyskanych przy poszczególnych stężeniach z wynikami prób kontrolnych zaleca się stosowanie regresyjnego testu Jonckheere'a-Terpstry lub testu Williamsa w odniesieniu do reakcji ciągłych oraz testu Cochrana-Armitage'a w odniesieniu do reakcji kwantowych, które są spójne z monotoniczną zależnością stężenie-odpowiedź oraz w przypadku braku dowodów na wariancję większą niż dwumianowa (14) W przypadku dowodu na wariancję większą niż dwumianowa zaleca się opracowaną przez Rao-Scotta korektę testu Cochrana-Armitage'a (15) (16) lub test Williamsa lub Dunnetta (po przekształceniu za pomocą funkcji pierwiastek kwadratowy arcsin) lub test Jonckheere'a-Terpstry zastosowany do wartości procentowych odnotowanych w kontrpróbie. Jeżeli dane nie są spójne z monotoniczną zależnością stężenie-odpowiedź, metoda Dunnetta lub Dunna lub Manna-Whitneya może okazać się przydatna w odniesieniu do reakcji ciągłych, a dokładny test Fishera – w odniesieniu do reakcji kwantowych (14) (17) (18). Niezależnie od stosowanej metody statystycznej czy stosowanego modelu statystycznego należy zadbać o spełnienie wymogów danej metody lub danego modelu (np. w układzie doświadczalnym i zastosowanym teście lub modelu została oszacowana i uwzględniona zmienność między komorami). Dane należy oceniać pod katem normalności, a w dodatku 5 podano sposób postępowania z resztami z ANOVA. W dodatku 6 omówione zostały dodatkowe względy dotyczące podejścia regresyjnego. Aby spełnić wymagania testu statystycznego, należy wziąć pod uwagę transformacje. Transformacje umożliwiające dopasowanie modelu regresji wymagają jednak dużej ostrożności, ponieważ np. 25-procentowa zmiana w nieprzekształconej reakcji nie odpowiada 25-procentowej zmianie w reakcji nieprzekształconej. W przypadku wszystkich analiz jednostką analizy jest komora badawcza, a nie pojedyncza ryba, i w związku z tym jednostka doświadczalna oraz testy hipotez i regresja powinny to odzwierciedlać (3) (14) (19) (20).

Sprawozdanie z badania

34. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

Substancja jednoskładnikowa

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lib InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach, na ile jest to możliwe w praktyce, itd. (w tym zawartość węgla organicznego w stosownych przypadkach).

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— jak najdokładniejsza charakterystyka, np. nazwa chemiczna (zob. powyżej), ilość i istotne właściwości fizykochemiczne składników.

Gatunek doświadczalny:

— nazwa systematyczna, szczep, źródło i metoda pobierania zapłodnionych jaj i dalsza obróbka.

▼M7

Warunki badania:

— zastosowana procedura badawcza (np. układ półstatyczny lub przepływowy, obciążenie);

— fotoperiod(-y);

— plan badania (np. liczba komór badawczych i kontrprób, liczba jaj w kontrpróbie, materiał i wielkość komory badawczej (wysokość, szerokość, objętość), objętość wody w każdej komorze badawczej);

— metoda przygotowania roztworów podstawowych i częstotliwość wymiany (należy określić środek zwiększający rozpuszczalność i jego stężenie, jeśli został zastosowany);

— metoda dawkowania badanej substancji chemicznej (np. pompy, układy rozcieńczające);

— sprawność odzyskowa metody i badane stężenia nominalne, granica oznaczalności, średnie wartości pomiarowych oraz ich odchylenia standardowe w naczyniach badawczych, a także metoda użyta do ich uzyskania oraz dowody świadczące o tym, że pomiary odnoszą się do stężeń badanej substancji chemicznej w rzeczywistym roztworze;

— cechy wody rozcieńczającej: pH, twardość, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom chloru resztkowego (jeśli dokonano pomiaru), całkowity węgiel organiczny (jeśli dokonano pomiaru), zawiesina (jeśli dokonano pomiaru), zasolenie ośrodka użytego do badania (jeśli dokonano pomiaru) oraz wszelkie inne wykonane pomiary;

— jakość wody w naczyniach badawczych: pH, twardość, temperatura i stężenie rozpuszczonego tlenu;

— szczegółowe informacje dotyczące karmienia (np. rodzaj pokarmu, źródło, podawana ilość i częstotliwość podawania).

Wyniki zgłaszane indywidualnie (lub na podstawie kontrprób) oraz jako średnia i współczynnik zmienności, w stosownych przypadkach, w odniesieniu do następujących punktów końcowych:

— dowody, że próby kontrolne spełniają normę dopuszczalności ogólnego wskaźnika przeżywalności dla gatunku doświadczalnego (dodatek 2);

— dane dotyczące upadkowości w każdym stadium (embrionalnym, larwalnym i młodocianym) oraz upadkowość zbiorcza;

— liczba dni do wylęgu, liczba larw wylegających się każdego dnia oraz zakończenie okresu wylęgu;

— liczba zdrowych ryb pod koniec badania;

— dane dotyczące długości ciała (podać długość standardową albo całkowitą) i masa ciała zwierząt, które przeżyły;

— częstość występowania, opis i liczba ewentualnych anomalii morfologicznych;

— częstość występowania, opis i liczba przypadków ewentualnego wpływu na zachowanie;

— metoda analizy statystycznej (analiza regresji lub analiza wariancji) oraz przetwarzanie danych (zastosowany test lub model statystyczny);

— najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, w odniesieniu do każdej ocenionej reakcji (NOEC);

▼M7

— najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, (dla p = 0,05) w odniesieniu do każdej ocenianej reakcji (LOEC);

— EC_x w odniesieniu do każdej ocenianej reakcji, jeżeli dotyczy, i przedziały ufności (np. 90 % lub 95 %) oraz wykres dopasowanego modelu wykorzystanego do obliczeń, nachylenie krzywej stężenie-odpowiedź, wzór modelu regresji, szacowane parametry modelu i ich błędy standardowe.

Wszelkie odstępstwa od metody badawczej.

Omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ odstępstw od niniejszej metody badawczej na wynik badania.

Tabela 1

Gatunki ryb zalecane do badania

SŁODKOWODNE	WODY ESTUARYJNE i MORSKIE:
Oncorhynchus mykiss Pstrąg tęczowy	*Cyprinodon variegatus* Karpieniec zmienny
Pimephales promelas Strzebla wielkogłowa	*Menidia sp.* Menidia berylka
Danio rerio Danio pręgowany	
Oryzias latipes Ryżanka japońska lub ryżanka	

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 171, OECD, Paryż.

(2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny. nr 23, OECD, Paryż.

(3) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów. E 1241-88. 26.

(4) Brauhn, J.L. i 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. i 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, s. 69–92.

(8) Rozdział C.20 niniejszego załącznika, Badanie wpływu substancji na rozrodczość *Daphnia magna*.

(9) Hansen, D.J. i P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (red. F.L. Mayer i 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, i 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, s. 370–376.

(14) 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 nr 54, OECD, Paryż.

(15) Rao, J.N.K. i A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, s. 577–585.

(16) Rao, J.N.K. i A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, s. 1373–1385.

(17) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of American Statistical Association, 50, s. 1096–1121.

(18) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, s. 482–491.

(19) Rand, G.M. i S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, Nowy Jork.

(20) McClave, J.T., J.H. Sullivan i J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Filadelfia.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICJE

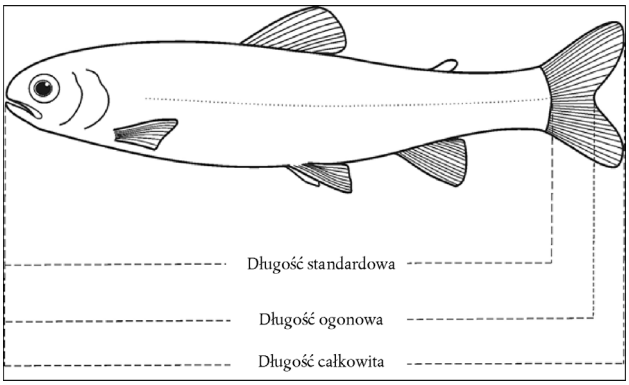
Długość ogonowa (FL): oznacza długość od czubka pyska do końca środkowego promienia płetwy ogonowej – parametr ten wykorzystuje się w odniesieniu do ryb, u których trudno jest wskazać miejsce, w którym kończy się kręgosłup (www.fishbase.org).

Długość standardowa (SL): oznacza długość ryby mierzoną od czubka pyska do tylnej krawędzi ostatniego kręgu lub do tylnej krawędzi środkowotylnej części urostylu. Krótko mówiąc, ramach tego pomiaru nie bierze się pod uwagę długości płetwy ogonowej (www.fishbase.org).

Długość całkowita (TL): oznacza długość mierzoną od czubka pyska do czubka dłuższego płata płetwy ogonowej, zazwyczaj mierzonego po zgięciu płatów do linii środkowej. Pomiar zdejmuje się wzdłuż linii prostej, nie wzdłuż krzywizny ciała ryby (www.fishbase.org).

Wykres 1

Opis różnych stosowanych długości



Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

EC_x: (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływu na organizmy doświadczalne w danym okresie narażenia, w porównaniu z próbą kontrolną. Na przykład EC_{50} jest stężeniem, które w przybliżeniu ma wpływ na punkt końcowy badania w 50 % narażonej populacji w określonym okresie narażenia.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, (LOEC) oznacza najmniejsze badane stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym obserwuje się wystąpienie statystycznie istotnego wpływu (przy $p \leq 0,05$) w porównaniu z próba kontrolną. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC powinny wywierać szkodliwy skutek równy skutkom lub większy niż skutki obserwowane przy LOEC. W przypadku gdy oba warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC). W dodatkach 5 i 6 przedstawiono dodatkowe wytyczne w tym zakresie.

Najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, (NOEC) oznacza badane stężenie nieznacznie niższe niż LOEC, które nie wywiera statystycznie istotnego wpływu ($p < 0,05$) w ustalonym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

IUPAC: Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

▼M7

Dodatek 2

WARUNKI BADANIA, CZAS TRWANIA BADANIA I KRYTERIA PRZEŻYCIA DLA ZALECANYCH GATUNKÓW

GATUNEK	WARUNKI BADANIA			ZALECANY CZAS TRWANIA BADANIA	Typowa minimalna średnia długość całkowita ryb kontrolnych pod koniec badania (mm) ([1])	PRZEŻYWALNOŚĆ RYB KONTROLNYCH (minimalna)	
	Temperatura (° C)	Zasolenie ($^0/_{00}$)	Fotoperiod (godziny)			Skuteczność wylęgu	Przeżywalność po wylęgu
Woda słodka:							
Oncorhynchus mykiss Pstrąg tęczowy	10 ± 1,5 ([2])		12–16 ([3])	2 tygodnie po rozpoczęciu swobodnego karmienia prób kontrolnych (lub po upływie 60 dni od wylęgu)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Strzebla wielkogłowa	25 ± 1,5		16	32 dni od dnia rozpoczęcia badania (lub po upływie 28 dni od wylęgu)	18	70 %	75 %
Danio rerio Danio pręgowany	26 ± 1,5		12–16 ([4])	po upływie 30 dni od wylęgu	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Ryżanka japońska lub ryżanka	25 ± 2		12–16 ([5])	po upływie 30 dni od wylęgu	17	80 %	80 %
Wody estuaryjne i morskie:							
Cyprinodon variegatus Karpieniec zmienny	25 ± 1,5	15–35 ([5])	12–16 ([4])	32 dni od dnia rozpoczęcia badania (lub po upływie 28 dni od wylęgu)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Menidia berylka	22–25	15–35 ([5])	13	28 dni	20	80 %	60 %

Legenda:

([1]) Choć typowa minimalna średnia długość całkowita nie stanowi kryterium ważności, wszelkie odchylenia poniżej podanej wartości powinny zostać szczegółowo zbadane, biorąc pod uwagę czułość badania. Minimalną średnią długość całkowitą wyprowadza się ze zbioru danych dostępnych w danym momencie.

([2]) Konkretny szczep pstrąga tęczowego wykorzystanego w badaniu może wymagać zastosowania innych temperatur. Tarlaki należy utrzymywać w takiej samej temperaturze jak temperatura, w której utrzymywane są jaja. Po otrzymaniu jaj od hodowcy prowadzącego działalność handlową konieczny jest krótki (np. 1–2 godzinny) okres adaptacji jaj do temperatury, w jakiej przeprowadza się badanie.

([3]) Ciemność w przypadku larw przez okres tygodnia od chwili wylęgu, chyba że są one poddawane analizie – wówczas przygaszone światło przez cały okres badania (12–16 godzinny fotoperiod) ([4]).

([4]) Dla wszelkich określonych warunków badania należy stosować te same warunki oświetlenia.

([5]) Niezależnie od rodzaju badania badanie należy przeprowadzać przy poziomie zasolenia mieszczącym się w granicach ± $2^0/_{00}$ od tej wartości.

▼M7

Dodatek 3

WYTYCZNE W ZAKRESIE KARMIENIA WYLĘGU I ZWIERZĄT DOŚWIADCZALNYCH ZALECANEGO GATUNKU ORAZ WYTYCZNE W ZAKRESIE POSTĘPOWANIA Z TYM WYLĘGIEM I Z TYMI ZWIERZĘTAMI DOŚWIADCZALNYMI

GATUNEK	PASZA (*)				CZAS PRZENIESIENIA PO WYLĘGU	CZAS PIERWSZEGO KARMIENIA
	Tarlaki	Nowo wyklute larwy	Osobniki młode			
			Rodzaj	Częstotliwość karmienia		
Woda słodka:						
Oncorhynchus mykiss Pstrąg tęczowy	pasza dla pstrągów	brak (α)	starter pstrągowy BSN	2–4 karmienia dziennie	14–16 dni od dnia wylęgu lub od dnia wypłynięcia narybku	19 dni od dnia wylęgu lub od dnia wypłynięcia narybku
Pimephales promelas Strzebla wielkogłowa	BSN, pasza w formie płatków, FBS	BSN	BSN48, pasza w formie płatków	2–3 razy dziennie	w momencie osiągnięcia skuteczności wylęgu na poziomie 90 %	2 dni po wylęgu
Danio rerio Danio pręgowany	BSN, pasza w formie płatków	Pasza dla larw dostępna na rynku, pierwotniaki (β), białko (γ)	BSN48, pasza w formie płatków	BSN raz dziennie; pasza w formie płatków dwa razy dziennie	w momencie osiągnięcia skuteczności wylęgu na poziomie 90 %	2 dni po wylęgu
Oryzias latipes Ryżanka japońska lub ryżanka	pasza w formie płatków	BSN, pasza w formie płatków (lub pierwotniaki lub wrotki)	BSN48, pasza w formie płatków (lub wrotki)	BSN raz dziennie; pasza w formie płatków dwa razy dziennie lub pasza w formie płatków i wrotki raz dziennie	nie dotyczy	6–7 dni po tarle
Wody estuaryjne i morskie:						
Cyprinodon variegatus Karpieniec zmienny	BSN, pasza w formie płatków, FBS	BSN	BSN48	2–3 karmienia dziennie	nie dotyczy	1 dzień po wylęgu / wypłynięciu narybku
Menidia sp. Menidia berylka	BSN48, pasza w formie płatków	BSN	BSN48	2–3 karmienia dziennie	nie dotyczy	1 dzień po wylęgu / wypłynięciu narybku

Legenda:

(*) Paszę należy podawać do momentu osiągnięcia stanu sytości. Aby nie dopuścić do nagromadzenia się odpadów, należy w miarę potrzeby usuwać nadmiar paszy i odchody.

FBS mrożone artemie; dorosłe osobniki należące do gatunku Artemia

BSN nauplius artemii; nowo wykluty

BSN48 nauplius artemii; w wieku 48 godzin

(α) larwy posiadające woreczek żółtkowym nie potrzebują pokarmu

(β) odfiltrowane z mieszanej hodowli

(γ) granulki powstałe w procesie fermentacji

02008R0440 — PL — 16.10.2019 — 008.001 — 2448

▼M7

Dodatek 4

NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE DOPUSZCZALNEJ WODY ROZCIEŃCZAJĄCEJ

Składnik	Stężenie graniczne
Cząstki stałe	5 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	2 mg/l
Amoniak niejonizowany	1 µg/l
Chlor resztkowy	10 µg/l
Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych	50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli	50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	25 ng/l
Glin	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Miedź	1 µg/l
Żelazo	1 µg/l
Ołów	1 µg/l
Nikiel	1 µg/l
Cynk	1 µg/l
Kadm	100 ng/l
Rtęć	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

▼M7

Dodatek 5

WYTYCZNE STATYSTYCZNE W ZAKRESIE USTALANIA WARTOŚCI NOEC

Informacje ogólne

Za jednostkę analityczną uznaje się zbiornik z kontrpróbą. Dlatego też w przypadku ciągłych pomiarów, np. pomiarów wielkości, należy obliczyć średnią lub medianę kontrpróby – w takim przypadku wartości obliczone dla kontrpróby uznaje się za dane do analizy. Należy wykazać moc stosowanych testów, najlepiej w oparciu o bazę danych historycznych poszczególnych laboratoriów. W odniesieniu do każdego punktu końcowego należy określić wpływ na wielkość, który można wykryć z 75–80 % mocą, wraz z testem statystycznym, który należy zastosować.

Zgodnie z informacjami zawartymi w bazach danych dostępnych w chwili opracowywania niniejszej metody badawczej moc można określić zgodnie z zalecanymi procedurami statystycznymi. Poszczególne laboratoria powinny wykazać swoją zdolność do spełnienia wymogów w zakresie mocy testu, przeprowadzając swoją własną analizę mocy albo wykazując, że współczynnik zmienności (CV) dla każdej reakcji nie przekracza 90. percentyla CV wykorzystanych przy opracowywaniu wytycznej dotyczącej badań. Odpowiednie wartości CV przedstawiono w tabeli 1. Jeżeli w danym przypadku dostępne są wyłącznie średnie lub mediany dla kontrpróby, można pominąć wartości CV odnotowane w ramach kontrpróby.

Tabela 1

90. percentyl CV dla wybranych gatunków ryb słodkowodnych

Gatunek	Reakcja	CV_między kontrpróbami	CV_w ramach kontrprób
Pstrąg tęczowy	Długość	17,4	9,8
	Masa	10,1	28
Strzebla wielkogłowa	Długość	16,9	13,5
	Masa	11,7	38,7
Danio pręgowany	Długość	43,7	11,7
	Masa	11,9	32,8

W ramach praktycznie wszystkich testów statystycznych przeprowadzanych w celu oceny badań toksykologicznych prowadzonych przez dane laboratorium za porównania będące przedmiotem zainteresowania uznaje się porównania między grupami badanymi a grupą kontrolną. Z tego względu ustanowienie wymogu przeprowadzenia istotnego testu F w ramach analizy wariancji przed przeprowadzeniem testu Dunnetta lub Williamsa lub ustanowienie wymogu przeprowadzenia istotnego testu Kruskala-Wallisa przed przeprowadzeniem testu Jonckheere'a-Terpstry, Manna-Whitneya lub Dunna nie jest odpowiednie (Hochberg i Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al.* 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

W ramach testu Dunnetta automatycznie dokonuje się korekty z tytułu wielokrotnych porównań, przy czym zastosowanie testu F jako tekstu kontrolnego (ang. *gatekeeper*) może niekorzystnie wpłynąć na odsetek wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych uzyskiwanych w rezultacie zastosowania tego testu. Podobnie zastosowanie regresyjnego testu Williamsa i regresyjnego testu Jonckheere'a-Terpstry, w których wykorzystuje się poziom istotności wynoszący 0,05 na każdym etapie testu, prowadzi do zachowania ogólnego odsetka wyników fałszywie dodatnich na poziomie 5 % – zastosowanie testu-F lub testu Kruskala-Wallisa w celach weryfikacyjnych (ang. gatekeeper) wywiera niekorzystny wpływ na ten odsetek oraz na siłę testów. W przypadku przeprowadzenia testu Manna-Whitneya i testu Dunna należy zastosować korektę z tytułu wielokrotnych porównań – w tym przypadku zaleca się zastosowanie korekty Bonferroniego-Holma.

Większość zaleceń dotyczących testowania hipotez i weryfikacji założeń leżących u podstaw wspomnianych testów została szczegółowo omówiona w wytycznych OECD z 2006 r., w których przedstawiono również obszerną literaturę poświęconą tej problematyce.

▼M7

Postępowanie próbami kontrolnymi w przypadku zastosowania rozpuszczalnika

W przypadku wykorzystania rozpuszczalnika należy uwzględnić zarówno próbę kontrolną z wodą rozcieńczającą, jak i próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem. Poszczególne reakcje odnotowane w tych dwóch grupach kontrolnych należy porównać i połączyć je do celów analizy statystycznej, jeżeli nie wykryto między nimi istotnej różnicy. W przeciwnym wypadku do celów oznaczenia NOEC lub oszacowania wartości EC_x należy wykorzystać próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem i nie należy opierać się na próbie kontrolnej z wodą. Zob. ograniczenie ustanowione w kryteriach ważności (pkt 7).

Jeżeli chodzi o dane dotyczące długości, masy, skuteczności wylęgu z jaj, upadkowości larw lub larw, u których zaobserwowano anomalie, a także dane dotyczące pierwszego lub ostatniego dnia wylęgu lub wypłynięcia narybku, do celów porównania próby kontrolnej z wodą rozcieńczającą z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem przy poziomie istotności wynoszącym 0,05, należy stosować test t-Studenta lub test Manna-Whitneya, pomijając wszystkie grupy badane. Wyniki tych testów należy odnotować w sprawozdaniu.

Pomiary wielkości (długość i masa)

Wartości dotyczące długości i masy poszczególnych ryb mogą przebiegać zgodnie z funkcją rozkładu normalnego lub zgodnie z funkcją rozkładu logarytmiczno-normalnego. Niezależnie od danego przypadku średnie wartości dla kontrprób przebiegają zazwyczaj zgodnie z funkcją rozkładu normalnego na podstawie centralnego twierdzenia granicznego, co znajduje potwierdzenie w danych zgromadzonych w ponad 100 badaniach we wczesnym stadium rozwoju przeprowadzonych w odniesieniu do trzech gatunków słodkowodnych. Alternatywnie, jeżeli z danych lub informacji zawartych w bazach danych historycznych wynika, że wartości dotyczące wielkości poszczególnych ryb przebiegają zgodnie z funkcją rozkładu normalnego, można obliczyć średnią logarytmiczną wartości dotyczących poszczególnych ryb w kontrpróbach, co umożliwi przeprowadzenie analizy na antylogarytmach średnich logarytmicznych obliczonych dla kontrprób.

Dane należy ocenić pod kątem spójności przy założeniu rozkładu normalnego i jednorodności wariancji. W tym celu należy skorzystać z reszt uzyskanych po zastosowaniu modelu ANOVA, wykorzystując stężenie jako jedyną zmienną objaśniającą. Dopuszcza się możliwość przeprowadzania analizy wzrokowej na podstawie wykresów punktowych i histogramów lub na podstawie szeregów rozdzielczych. Alternatywnie można zastosować test formalny, np. test Shapiro-Wilka lub test Andersona-Darlinga. Zgodność z jednorodnością wariancji można ocenić, poddając ten sam wykres punktowy analizie wzrokowej lub przeprowadzając formalny test Levene'a. Wymóg przeprowadzenia oceny zgodności z rozkładem normalnym lub oceny jednorodności wariancji obowiązuje wyłącznie w przypadku testów parametrycznych (np. testu Williamsa, testu Dunnetta).

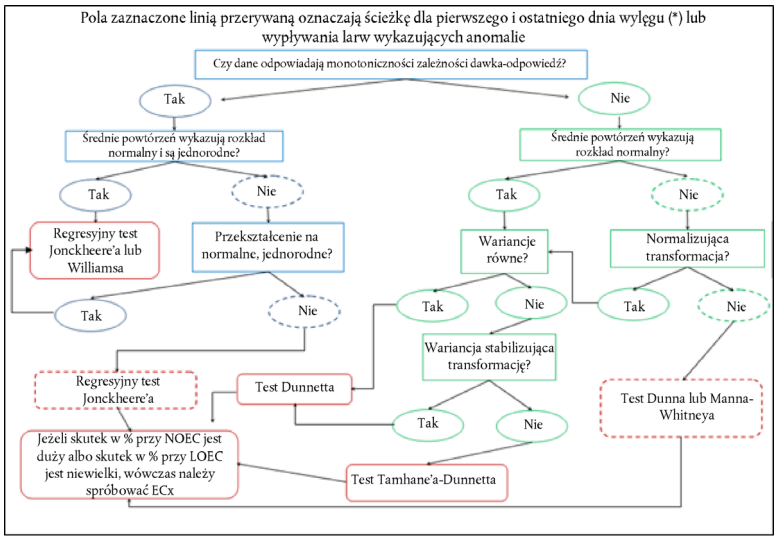
Należy pamiętać o możliwości wystąpienia wartości odstających i o ich wpływie na analizę. W tym kontekście dopuszcza się możliwość zastosowania testu Tukeya na wartość odstającą oraz przeprowadzenia analizy wzrokowej tych samych wykresów reszt, o której mowa powyżej. Należy pamiętać, że przedmiotem obserwacji są całe kontrpróby, dlatego też decyzję o pominięciu wartości odstającej w analizie należy podjąć wyłącznie po dokładnym rozpatrzeniu danego przypadku.

Do testów statystycznych, w których wykorzystuje się specyficzne elementy związane z układem doświadczalnym i oczekiwanymi wartościami biologicznymi, zalicza się regresyjne testy tendencji, np. test Williamsa i test Jonckheere'a-Terpstry. W ramach tych testów zakłada się monotoniczność zależności stężenie-odpowiedź, przy czym dane powinny zostać ocenione pod kątem zgodności z tym założeniem. Taką ocenę można przeprowadzić, dokonując analizy wzrokowej wykresu punktowego, na którym średnie wartości odnotowane dla poszczególnych kontrprób zostały zestawione z badanym stężeniem. W tym kontekście pomocne może okazać się nałożenie segmentowego wykresu liniowego łączącego wartości średnich stężeń ważonych wielkością kontrprób na wykres punktowy. Znaczne odchylenie segmentowego wykresu liniowego od monotoniczności może świadczyć o konieczności zastosowania testów innych niż testy tendencji. Alternatywnie można zastosować testy formalne. W ramach podstawowego testu formalnego oblicza się kontrasty liniowe i kwadratowe dla średnich wartości stężenia. Jeżeli po przeprowadzeniu stosownych obliczeń okaże się, że kontrast kwadratowy jest istotny, a kontrast liniowy nie, może to świadczyć o wystąpieniu problemu związanego z monotonicznością, który powinien zostać poddany dalszej analizie w oparciu o wykresy. Jeżeli podejrzewa się, że źródłem problemu mogą być kwestie związane z rozkładem normalnym lub jednorodnością wariancji, wspomniane kontrasty można sporządzić w oparciu o dane pozyskane w rezultacie przeprowadzenia transformacji pozycyjno-rangowej. Dopuszcza się również możliwość zastosowania alternatywnych procedur, np. testu monotoniczności Bartholomew'a, ale takie procedury zwiększają złożoność analizy.

▼M7

Rysunek 2

Schemat pomiarów wielkości (długość i masa) NOEC



(*) Tego typu reakcje nigdy nie spełniają założeń analizy parametrycznej ani modeli parametrycznych.

O ile dane nie będą sprzeczne z wymogami przewidzianymi dla tego rodzaju testów, wartość NOEC ustala się, stosując regresyjny test Williamsa lub regresyjny test Jonckheere'a-Terpstry. Szczegółowe informacje na temat stosownych procedur przedstawiono w wytycznych OECD z 2006 r. W odniesieniu do danych, które nie spełniają wymogów regresyjnego testu tendencji, dopuszcza się możliwość zastosowania testu Dunnetta lub testu Tamhane'a-Dunnetta (T3), ponieważ w ramach tych testów automatycznie dokonuje się korekty z tytułu wielokrotnych porównań. Testy te bazują na założeniu rozkładu normalnego, a w przypadku testu Dunnetta – jednorodności wariancji. Jeżeli wspomniane warunki nie zostaną spełnione, można zastosować nieparametryczny test Dunna. Szczegółowe informacje na temat wszystkich wspomnianych testów zawarto w wytycznych OECD z 2006 r. Na podstawie ogólnych informacji przedstawionych na rys. 2 można ustalić, który test należy zastosować w danym przypadku.

Wylęg z jaj i przeżywalność larw

Dane przyjmują postać wartości procentowej wskazującej odsetek jaj, z których wykluły się nowe osobniki, lub odsetek larw, które przeżyły, w poszczególnych kontrpróbach. Takie dane powinny zostać ocenione pod kątem wariancji większej niż dwumianowa, co stanowi typową, ale nie powszechnie stosowaną, metodę oceny stosowaną w odniesieniu do tego rodzaju pomiarów. Informacje zawarte na schemacie przedstawionym na rys. 3 dostarczają wskazówek przydatnych przy dokonywaniu wyboru odpowiedniego testu; testy zostały szczegółowo omówione w tekście.

W tym kontekście zazwyczaj stosuje się dwa testy: test Tarone'a C(α) (Tarone, 1979) i test chi kwadrat, każdy z nich przeprowadzany niezależnie dla poszczególnych badanych stężeń. Jeżeli w przynajmniej jednym badanym stężeniu odnotowana zostanie wariancja większa niż dwumianowa, należy zastosować metody zapewniające możliwość należytego uwzględnienia tego faktu.

Wzór 1

Test Tarone'a C (α) (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{2\sum_{j=1}^{m} n_j(n_j - 1)\right\}^{1/2}}$$

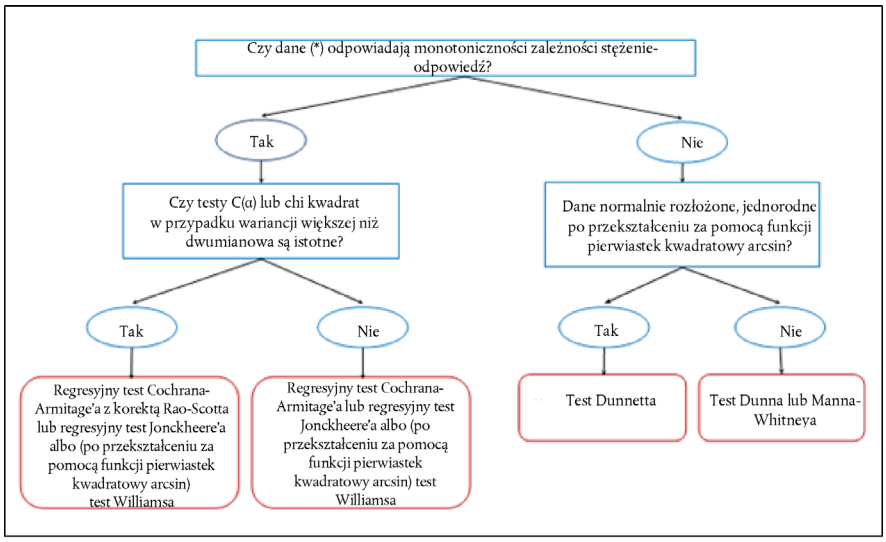
gdzie $\hat{p}$ oznacza średnią wartość procentową dla danego stężenia, **m** oznacza liczbę zbiorników z kontrpróbą, $\mathbf{n_j}$ oznacza liczbę osobników w kontrpróbie **j**, a $\mathbf{x_j}$ oznacza liczbę osobników reagujących w danej kontrpróbie, tj. niewyklutych

▼M7

lub martwych. Test ten przeprowadza się dla każdego stężenia z osobna. Test ten można przeprowadzić w formie dostosowanego testu chi kwadrat, ale z przeprowadzonych przez Tarone'a ograniczonych symulacji mocy wynika, że moc testu Tarone'a jest większa niż moc testu chi kwadrat.

Rysunek 3

Schemat wylęgu z jaj i upadkowości larw NOEC



(*) Dane mają postać wartości procentowej odnotowanej w kontrpróbie

W przypadku braku istotnych dowodów wskazujących na wystąpienie wariancji większej niż dwumianowa można zastosować regresyjny test Cochrana-Armitage'a. W ramach tego testu pomija się kontrpróby, a więc w przypadku wystąpienia dowodów świadczących o wystąpieniu wariancji większej niż dwumianowa, zaleca się zastosowanie korekty Rao-Scotta w odniesieniu do testu Cochrana-Armitage'a (RSCA), co pozwoli wziąć pod uwagę kontrpróby, wielkość kontrprób i wariancję większą niż dwumianowa. Alternatywne testy, jakie można zastosować w tym kontekście, to regresyjny test Williamsa, regresyjny test Jonckheere'a-Terpstry oraz regresyjny test Dunnetta, jak opisano w sekcji poświęconej pomiarom wielkości. Testy te można zastosować niezależnie od tego, czy w danym przypadku występuje wariancja większa niż dwumianowa, przy czym ich moc jest nieco mniejsza (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao i Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Pierwszy lub ostatni dzień wylęgu lub wypłynięcia narybku

Reakcja jest liczbą całkowitą i wskazuje dzień badania, w którym dokonano określonej obserwacji w danym zbiorniku z kontrpróbą. Zakres wartości jest zazwyczaj bardzo ograniczony i często charakteryzuje się znacznym udziałem wartości powiązanych, np. pierwszy dzień wylęgu odnotowuje się we wszystkich kontrpróbach, a także – potencjalnie – w jednej lub dwóch próbach kontrolnych poddanych działaniu niższych badanych stężeń. Zastosowanie testów parametrycznych – takich jak test Williamsa i Dunnetta – w odniesieniu do takich danych nie jest odpowiednie. W przypadku braku dowodów świadczących o wystąpieniu poważnego przypadku braku monotoniczności uznaje się, że zastosowanie regresyjnego testu Jonckheere'a-Terpstry zapewnia dostateczną moc, aby wykryć wpływ poddania działaniu badanej substancji chemicznej. W przeciwnym razie można zastosować test Dunna.

Anomalie u larw

Reakcja odpowiada liczbie larw, u których stwierdzono wystąpienie określonych anomalii. Przedmiotowa reakcja często cechuje się niską incydencją i wiąże się z podobnymi problemami jak te odnotowywane w przypadku pierwszego dnia wylęgu; ponadto niekiedy można zaobserwować jej zmienność, jeżeli chodzi o zależność stężenie-odpowiedź. Jeżeli rozkład danych jest przynajmniej w ogólnym zarysie zbliżony do rozkładu właściwego dla stężenia monotonicznego, uznaje się, że zastosowanie regresyjnego testu Jonckheere'a-Terpstry zapewnia dostateczną moc, aby wykryć wpływ poddania działaniu substancji chemicznej. W przeciwnym razie można zastosować test Dunna.

▼**M7**

BIBLIOGRAFIA

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, wydanie drugie, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, s. 1096–1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, s. 241–252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, s. 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, s. 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, s. 431–454.

Hochberg, Y. i A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, Nowy Jork.

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, s. 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, Londyn.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Seria dotycząca badań i oceny, nr 54. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, OECD, Paryż.

Rao, J.N.K. i Scott, A.J. (1992) – A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, s. 577–585.

Rao, J.N.K. i Scott, A.J. (1999) – A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, s. 1373–1385.

Robertson, T., Wright F.T. i Dykstra R.L. (1988); Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, s. 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, s. 103–117.

Williams, D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, s. 519–531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, s. 949–952.

Williams, D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, s. 9–14.

▼M7

Dodatek 6

WYTYCZNE STATYSTYCZNE W ZAKRESIE SZACOWANIA REGRESJI

Informacje ogólne

Obserwacje wykorzystywane w modelu to średnie wartości odnotowane w kontrpróbie (długość i masa) lub wartości procentowe odnotowane w kontrpróbie (skuteczność wylęgu z jaj i upadkowość larw) (OECD 2006).

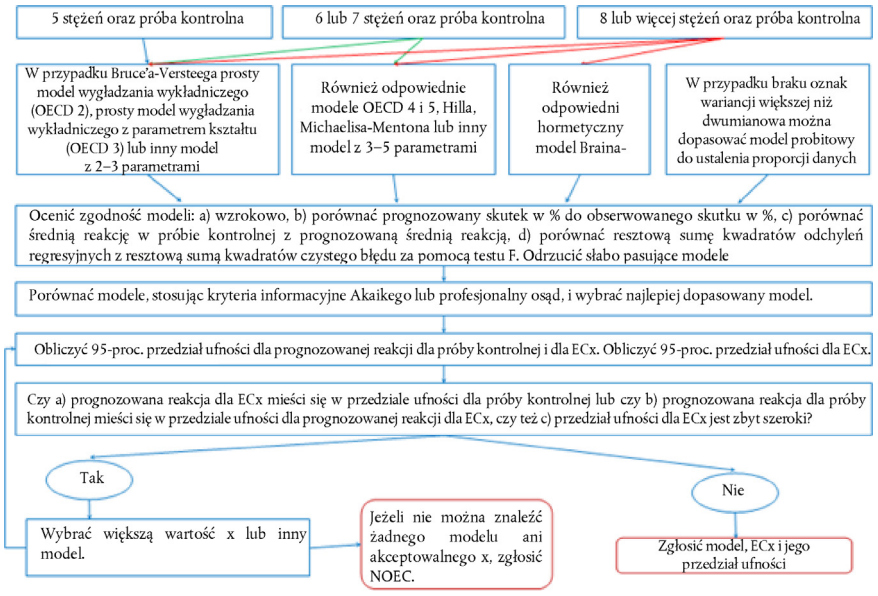
Zasadniczo zaleca się stosowanie regresji ważonej wielkością próbki pobranej z kontrpróby. Dopuszcza się również możliwość zastosowania innych systemów ważenia, takich jak ważenie przewidywaną średnią reakcją lub połączenie tej metody ważenia z ważeniem wielkością próbki pobranej z kontrpróby. Ważenie odwrotnością wariancji stężenia wewnątrz próbki nie jest zalecane (Bunke *et al.* 1999, Seber i Wild, 2003, Motulsky i Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Wszelkie transformacje reakcji przed analizą powinny zapewnić możliwość zachowania niezależności obserwacji i ECx, a granice ufności powinny zostać wyrażone w pierwotnych jednostkach miary, a nie w jednostkach po transformacji. Na przykład zmiana wartości logarytmu długości o 20 % nie jest równoważna 20-procentowej zmianie długości (Lyles *et al.* 2008, Draper i Smith 1999).

Schemat przedstawiony na rys. 4 zawiera ogólne informacje dotyczące sporządzania szacunków ECx. Bardziej szczegółowe informacje na ten temat przedstawiono poniżej.

Rysunek 4

Schemat sporządzania szacunków EC_x dotyczących średniej długości i masy lub procentowej wartości wylęgu z jaj lub upadkowości larw w kontrpróbie – bardziej szczegółowe informacje w tym zakresie znajdują się w tekście.



Kwestie związane z wylęgiem z jaj i upadkowością larw

Jeżeli chodzi o wylęg z jaj i upadkowość larw, zasadniczo najlepiej jest dopasować model spadkowy, chyba że dopasowuje się model probitowy, jak opisano poniżej. Oznacza to, że w modelu należy wziąć pod uwagę odsetek jaj, z których nie wylęgły się nowe osobniki, lub odsetek padłych larw. Wynika to z faktu, że wartość ECx oznacza stężenie, w przypadku którego odnotowuje się zmianę odpowiadającą x % średniej reakcji w danej próbie kontrolnej. Jeżeli z 5 % jaj w próbie kontrolnej nie wylęgną się nowe osobniki, a stosowany model bazuje na wskaźniku niewylęgnięcia się nowych osobników z jaj, wartość EC20 odpowiada stężeniu, przy którym odnotowuje się zmianę odpowiadającą 20 % wartości 5-procentowego wskaźnika niewylęgnięcia się nowych osobników z jaj w próbie kontrolnej, co odpowiada zmianie o 0,2*0,05=0,01 lub 1 punkt

▼M7

procentowy – w rezultacie wartość wskaźnika niewylęgnięcia się nowych osobników z jaj wynosi 6 %. Takiej niewielkiej zmiany nie można oszacować w rozsądny sposób na podstawie dostępnych danych i nie jest ona istotna z biologicznego punktu widzenia. Jeżeli jednak stosowany model bazuje na wartości procentowej określającej odsetek jaj, z których wylęgły się nowe osobniki, wartość procentowa dla próby kontrolnej wyniosłaby w omawianym przypadku 95 %, a 20-procentowy spadek w stosunku do średniej dla próby kontrolnej oznaczałby zmianę o 0,95*0,2=0,18, a zatem skuteczność wylęgu zmniejszyłaby się z 95 % do 77 % (= 95 – 18) – w takim przypadku można oszacować wpływ na stężenie, a opisane obliczenia mają istotniejsze znaczenie. Opisana problematyka nie ma większego znaczenia w kontekście pomiarów wielkości, choć niekorzystny wpływ na wielkość zasadniczo oznacza spadek wielkości.

Modele wykorzystywane przy pomiarze wielkości (długości lub masy) oraz skuteczności wylęgu z jaj lub przeżywalności larw.

Poza hormetycznym modelem Braina-Cousensa wszystkie te modele zostały opisane w wytycznych OECD z 2006 r. i zgodnie z treścią tych wytycznych zaleca się ich stosowanie. Modele określane jako OECD 2–5 zostały również omówione w kontekście doświadczeń w dziedzinie ekotoksyczności w Slob (2002). Istnieje oczywiście wiele innych modeli, które mogą okazać się przydatne. Bunke *et al*. (1999) wymienia szereg modeli, które nie zostały omówione w niniejszym opracowaniu, przy czym w literaturze przedmiotu można znaleźć liczne odniesienia do innych modeli. Zaproponowane poniżej powszechnie stosowane modele uznano za szczególnie odpowiednie w kontekście doświadczeń w dziedzinie ekotoksyczności.

Modele z pięcioma badanymi stężeniami i próbą kontrolną

— model Bruce'a-Versteega

— prosty model wykładniczy (OECD 2)

— prosty model wygładzania wykładniczego z parametrem kształtu (OECD 3)

— prosty model wykładniczy z metodą zerową (OECD 4)

Modele z sześcioma lub większą liczbą badanych stężeń i próbą kontrolną

— model wygładzania wykładniczego z parametrem kształty i metodą zerową (OECD 5)

— model Michaelisa-Mentena

— model Hilla

W przypadku odnotowania metodą wzrokową symptomów świadczących o wystąpieniu hormezy (której wystąpienie jest mało prawdopodobne w przypadku skutecznego wylęgu z jaj lub przeżywalności larw, ale która może wystąpić w ramach obserwacji wielkości)

— hormetyczny model Braina-Cousensa; Brain i Cousens (1989)

Alternatywne modele, które można zastosować przy przeprowadzaniu pomiarów poziomu niewylęgnięcia się nowych osobników z jaj i upadkowości larw

— modele bazujące na wzroście stosowane w przypadku tych reakcji mogą zostać dopasowane w oparciu o modele probitowe (lub logistyczne), jeżeli nie istnieją dowody świadczące o wystąpieniu wariancji większej niż dwumianowa, a poziom incydencji w próbie kontrolnej szacuje się przy dopasowywaniu modelu. Stosowanie takiej metody dopasowywania nie jest zalecane, ponieważ w jej ramach za jednostkę analizy uznaje się pojedyncze osobniki, a nie kontrpróbę (Morgan 1992, O'Hara Hines i Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Zgodność pojedynczego modelu

— należy przeprowadzić analizę wzrokową zaobserwowanego i przewidywanego spadku wartości procentowej poszczególnych badanych stężeń (Motulsky i Christopoulos 2004, Draper i Smith 1999);

— korzystając z testu F, należy porównać błąd średniokwadratowy regresji z czystym błędem średniokwadratowym (Draper i Smith 1999);

— należy sprawdzić, czy wszystkie parametry stosowane w modelu są istotnie różne od zera (tj. należy ustalić, czy wszystkie parametry stosowane w modelu są istotne) (Motulsky i Christopoulos 2004);

▼M7

— należy zestawić reszty z regresji z wartością badanego stężenia na wykresie, najlepiej stosując skalę log(stężenie). Wykresu nie należy wykreślać w oparciu o jakikolwiek schemat; punkty należy rozmieścić losowo wzdłuż linii poziomej na wysokości zerowej;

— dane należy ocenić pod kątem zgodności z rozkładem normalnym i jednorodności wariancji zgodnie z metodą opisaną w dodatku 5;

— ponadto należy ocenić zgodność rozkładu reszt pozostałych po zastosowaniu modelu regresji z rozkładem normalnym, stosując te same metody co opisane w dodatku 5 metody dotyczące reszt z analizy ANOVA.

Porównywanie modeli

— należy stosować kryteria informacyjne Akaikego (AICc). Niższe wartości uzyskane po zastosowaniu kryteriów informacyjnego Akaikego świadczą o lepszym dopasowaniu, a jeżeli AICc(B)-AICc(A) ≥10, wówczas model A jest prawie na pewno lepszy niż model B (Motulsky i Christopoulos (2004));

— należy porównać dwa modele metodą wzrokową, koncentrując się na tym, w jakim stopniu spełniają one przedstawione powyżej kryteria dotyczące pojedynczego modelu;

— zaleca się zastosowanie zasady prostoty, która stanowi, że należy korzystać z najprostszego modelu, który można w rozsądny sposób dopasować do danych (Ratkowsky 1993, Lyles et al. 2008).

Jakość szacunków EC_x

Przedział ufności (CI) dla EC_x nie powinien być zbyt szeroki. Przy podejmowaniu decyzji dotyczącej szerokości przedziału ufności dla ECx, jaką można przyjąć, by zachować użyteczność ECx, należy kierować się właściwym osądem statystycznym. Wyniki symulacji modeli regresji dopasowanych do danych dotyczących wylęgu z jaj i wielkości wskazują, że około 75 % przedziałów ufności dla EC_x (x=10, 20 lub 30) obejmuje co najwyżej dwa badane stężenia. Symulacje dostarczają ogólnych wskazówek na temat wartości, jakie można uznać za dopuszczalne, oraz praktycznych wskazówek na temat wartości, jakie są możliwe do osiągnięcia. Szereg autorów zwraca uwagę na konieczność ujawniania przedziałów ufności dla wszystkich parametrów wykorzystywanych w modelu oraz podkreśla, że ustanowienie szerokich przedziałów ufności w odniesieniu do parametrów wykorzystywanych w modelach skutkuje tym, że takie modele należy uznać za niedopuszczalne (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).

Przedział ufności dla EC_x (lub dla jakiegokolwiek innego parametru wykorzystywanego w modelu) nie powinien zawierać zera (Motulsky i Christopoulos 2004). Wartość ta odpowiada regresji równoważnej najmniejszej istotnej różnicy często przywoływanej w podejściach dotyczących testowania hipotez (np. Wang *et al*. 2000). Odpowiada ona również przedziałowi ufności, ponieważ średnie reakcje przy LOEC nie obejmują średniej dla próby kontrolnej. Należy ocenić, czy szacunki dotyczące danego parametru są wiarygodne z naukowego punktu widzenia. Na przykład jeżeli przedział ufności dla y0 wynosi ±20 %, żadne szacunki EC_{10} nie będą wiarygodne. Jeżeli w modelu przewiduje się 20-procentowy wpływ przy stężeniu C, a maksymalny zaobserwowany wpływ przy stężeniu C i przy niższych stężeniach wynosi 10 %, wówczas wartość EC_{20} należy uznać za niewiarygodną (Motulsky i Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

Oszacowanie wartości EC_x nie powinno wiązać się z koniecznością dokonania ekstrapolacji wykraczającej poza zakres stężeń dodatnich (Draper i Smith 1999, OECD 2006). Na przykład orientacyjnie można przyjąć, że wartość EC_x nie powinna być niższa od najniższego zbadanego stężenia o więcej niż 25 % lub nie powinna być wyższa od najwyższego zbadanego stężenia o więcej niż 25 %.

BIBLIOGRAFIA

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, s. 155–163.

Brain P. i Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: s. 93–96.

▼**M7**

Bunke, O., Droge, B. i Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, s. 197–240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, wydanie drugie, Chapman and Hall, Londyn.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, wydanie drugie, Chapman and Hall, Londyn.

Draper, N.R. i Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, wydanie trzecie. Nowy Jork: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, sprawozdanie 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, Nowy Jork.

Lyles, R. H.,C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, i C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. listopad 2008; 29(6): s. 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, Londyn.

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. i J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* t. 49, s. 107–121.

OECD (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Seria dotycząca badań i oceny, nr 54, Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, OECD, Paryż.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, wydanie szóste, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA.

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, s. 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, s. 298–312.

Wang, Q., D.L. Denton i R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, t. 19, s. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. KRÓTKOTERMINOWE BADANIE ROZRODCZOŚCI RYB

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 229 (2012). Konieczność opracowania i zweryfikowania badania ryb umożliwiającego wykrycie substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego wynika z obawy, że środowiskowe poziomy substancji chemicznych mogą wywoływać działania niepożądane zarówno u ludzi, jak i w przypadku dzikiej flory i fauny ze względu na interakcję tych substancji chemicznych z układem hormonalnym. W 1998 r. OECD zapoczątkowała działania o najwyższym priorytecie mające na celu przegląd istniejących wytycznych dotyczących badań i opracowanie nowych wytycznych dotyczących odsiewania i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Jednym z elementów tych działań było opracowanie wytycznej dotyczącej badań w odniesieniu do odsiewania substancji chemicznych oddziałujących na układ hormonalny określonych gatunków ryb. Krótkoterminowe badanie rozrodczości ryb poddano zakrojonemu na szeroką skalę programowi weryfikacji, który obejmował badania międzylaboratoryjne z wykorzystaniem wybranych substancji chemicznych, aby wykazać, że badanie przesiewowe stanowi istotną i wiarygodną metodę wykrywania substancji chemicznych, które mają wpływ na rozrodczość ryb, za pomocą różnych mechanizmów, w tym zmian hormonalnych (1, 2, 3, 4, 5). Wszystkie punkty końcowe określone w dotyczącej badań wytycznej OECD zostały zweryfikowane na strzebli wielkogłowej, przy czym podzbiór punktów końcowych zostały zweryfikowany na ryżance japońskiej (tj. witellogenina i drugorzędowe cechy płciowe) oraz na danio pręgowanym (tj. witellogenina). Działania weryfikacyjne zostały zrecenzowane częściowo przez panel ekspertów powołanych przez koordynatorów krajowych programu wytycznych dotyczących badań OECD (6), a częściowo przez niezależny panel ekspertów powołany przez Agencję Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (29). Przedmiotowe badanie nie ma na celu zidentyfikowania konkretnych mechanizmów zaburzeń hormonalnych, ponieważ zwierzęta doświadczalne mają nieuszkodzoną oś podwzgórze-przysadka-gonady, która może reagować na substancje chemiczne wywierające wpływ na tę oś na różnych poziomach.

2. W niniejszej metodzie badawczej opisuje się badanie przesiewowe *in vivo*, w którym dojrzałe płciowo samce ryb i samice ryb w okresie tarła utrzymuje się razem i poddaje działaniu substancji chemicznej przez ograniczoną część ich cyklu życia (21 dni). Na zakończenie 21-dniowego okresu narażenia mierzy się dwa punkty końcowe biomarkerów u samców i samic jako wskaźniki oddziaływania badanej substancji chemicznej na układ hormonalny; te punkty końcowe to witellogenina i drugorzędowe cechy płciowe. Witellogeninę mierzy się u strzebli wielkogłowej, ryżanki japońskiej i danio pręgowanego, natomiast drugorzędowe cechy płciowe mierzy się u strzebli wielkogłowej i ryżanki japońskiej. Ponadto przez cały czas trwania badania codziennie przeprowadza się pomiar płodności w ujęciu ilościowym. Zachowuje się również gonady, dzięki czemu można przeprowadzić analizę histopatologiczną i ocenić sprawność rozrodczą zwierząt doświadczalnych, co zwiększa wagę dowodów zgromadzonych dla innych punktów końcowych.

3. Niniejszy test biologiczny pełni rolę badania przesiewowego rozrodczości *in vivo*, a kwestie związane z jego stosowaniem regulują postanowienia dokumentu pt. „OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” (30). W ramach koncepcyjnych ustanowionych w przywołanym powyżej dokumencie krótkoterminowe badanie rozrodczości ryb zostało wstępnie sklasyfikowane na poziomie 3 jako badanie *in vivo* dostarczające danych na temat wybranych mechanizmów/ścieżek wywierania wpływu na funkcjonowanie układu hormonalnego.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

4. Witellogenina (VTG) jest normalnie wytwarzana w wątrobie jajorodnych kręgowców płci żeńskiej w reakcji na endogenny estrogen w układzie krążenia. Jest ona prekursorem białek żółtka i po wytworzeniu w wątrobie jest przenoszona przez krew do jajnika, gdzie jest pobierana i modyfikowana przez rozwijające się jaja. Witellogenina jest niemalże niewykrywalna w osoczu niedojrzałych samic i samców ryb, ponieważ nie mają one wystarczającej ilości estrogenu w krwiobiegu; wątroba ma jednak zdolność syntezy i wydzielania witellogeniny w reakcji na egzogenną stymulację estrogenem.

▼M7

5. Pomiar witellogeniny służy wykrywaniu substancji chemicznych o różnych estrogennych charakterach działania. Wykrycie estrogennych substancji chemicznych jest możliwe dzięki pomiarowi indukcji witellogeniny u samców ryb i zostało bogato udokumentowane w recenzowanej literaturze naukowej (np. (7)). Indukcję witellogeniny wykazano również po narażeniu na działanie aromatyzowalnych androgenów (8, 9). Obniżenie poziomu estrogenu w układzie krążenia w przypadku samic, na przykład na skutek inhibicji aromatazy przekształcającej endogenny androgen w naturalny estrogen 17β-estradiol, powoduje zmniejszenie poziomu VTG, którą wykorzystuje się do wykrywania substancji chemicznych działających jak inhibitory aromatazy (10, 11). Biologiczne znaczenie reakcji witellogeniny po inhibicji aktywności substancji estrogennej/aromatazy zostało ustalone i szeroko udokumentowane. Możliwe jest jednak, że na wytwarzanie VTG u samic mogą również wpływać ogólna toksyczność i niehormonalne sposoby działania toksycznego, np. hepatotoksyczność.

6. Opracowano i znormalizowano z dobrym wynikiem kilka metod pomiaru w celu rutynowego wykorzystywania. Dotyczy to metod opartych na właściwym dla danego gatunku teście immunoenzymatycznym (ELISA), w którym wykorzystuje się immunochemię do oznaczenia ilościowego wytworzonej VTG w małych próbkach krwi lub wątroby pobranych od pojedynczych osobników ryb (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). W celu dokonania pomiaru VTG pobiera się próbki krwi strzebli wielkogłowej, krwi lub homogenatu głowy/ogona danio pręgowanego i wątroby ryżanki. W przypadku ryżanki istnieje dobra korelacja między VTG mierzoną w próbkach krwi i wątroby (19). W dodatku 6 przedstawiono zalecane procedury pobierania próbek do celów analizy VTG. Zestawy do pomiaru VTG są powszechnie dostępne; powinny one opierać się na zweryfikowanej, właściwej dla danego gatunku metodzie ELISA.

7. Drugorzędowe cechy płciowe samców niektórych gatunków ryb są widoczne na zewnątrz, są kwantyfikowalne oraz reagują na poziom endogennych androgenów w krwiobiegu; dotyczy to strzebli wielkogłowej i ryżanki, lecz nie danio pręgowanego, który nie posiada kwantyfikowalnych drugorzędowych cech płciowych. Samice zachowują zdolność do wykształcania drugorzędowych męskich cech płciowych, gdy zostaną narażone na działanie androgennych substancji chemicznych w wodzie. W literaturze przedmiotu można znaleźć kilka badań, które dokumentują tego rodzaju reakcję u strzebli wielkogłowej (20) i ryżanki (21). Zmniejszenie nasilenia drugorzędowych cech płciowych u samców należy interpretować ostrożnie ze względu na niską wartość mocy statystycznej, opierając się na specjalistycznej opinii i wadze dowodów. Istnieją ograniczenia w zakresie wykorzystania danio pręgowanego w tym badaniu ze względu na brak kwantyfikowalnych drugorzędowych cech płciowych, które reagują na substancje chemiczne o działaniu androgennym.

8. W przypadku strzebli wielkogłowej głównym wskaźnikiem egzogennego narażenia na działanie androgenne jest liczba guzków godowych na pysku samic ryb. W przypadku ryżanki liczba procesów tworzenia się brodawek stanowi główny marker egzogennego narażenia samic ryb na substancje chemiczne o działaniu androgennym. W dodatkach 5A i 5B wskazano zalecane procedury, które należy stosować do oceny cech płciowych odpowiednio u strzebli wielkogłowej i ryżanki.

9. W ramach 21-dniowego badania ryb przeprowadza się ilościową ocenę wytwarzania jaj oraz zachowuje się gonady na potrzeby ewentualnej analizy histopatologicznej. Niektóre organy regulacyjne mogą ustanowić wymóg stosowania takiego dodatkowego punktu końcowego, aby zapewnić możliwość przeprowadzenia bardziej kompletnej oceny sprawności rozrodczej zwierząt doświadczalnych lub w przypadkach, gdy witellogenina i drugorzędowe cechy płciowe nie reagują na narażenie na działanie substancji chemicznej. Choć niektóre punkty końcowe mogą mieć wysoce diagnostyczny charakter (np. indukcja VTG u samców i tworzenie się guzków u samic), nie wszystkie punkty końcowe (np. płodność i histopatologia

▼M7

gonad) wykorzystywane w badaniu mają w założeniu umożliwić jednoznaczną identyfikację określonych mechanizmów oddziaływania komórkowego. Zestaw punktów końcowych, traktowanych zbiorczo, zapewnia możliwość wyciągnięcia pewnych wniosków dotyczących potencjalnych zaburzeń funkcjonowania układu hormonalnego i tym samym zapewnia wskazówki w zakresie prowadzenia dalszych badań. Choć płodność nie stanowi parametru specyficznego dla funkcjonowania układu hormonalnego, z uwagi na jej udowodnioną wrażliwość na znane substancje chemiczne zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego (5), stanowi ona istotny punkt końcowy, który należy wziąć pod uwagę, ponieważ jeżeli ten i pozostałe punkty końcowe pozostaną niezmienione, pozwoli to uzyskać większy poziom pewności co do tego, że dany związek chemiczny prawdopodobnie nie zaburzy funkcjonowania układu hormonalnego. Jeżeli jednak odnotowany zostanie wpływ na płodność, będzie to miało istotne znaczenie dla wniosków wyciągniętych na podstawie wagi dowodów. Wytyczne w zakresie interpretacji danych i przyjmowania wyników badań przedstawiono w dalszej części niniejszej metody badawczej.

10. Definicje stosowane w niniejszej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

11. W trakcie badania samce i samice ryb w stanie reprodukcyjnym poddaje się wspólnie narażeniu w naczyniach badawczych. Ich status osobników dorosłych oraz ich stan reprodukcyjny pozwalają na wyraźne rozróżnienie płci, a tym samym na przeprowadzenie związanej z płcią analizy każdego punktu końcowego, jak również zapewniają wrażliwość na egzogenne substancje chemiczne. Po zakończeniu badania płeć potwierdza się w badaniu makroskopowym gonad po otwarciu brzucha wzdłuż linii środkowej za pomocą nożyczek. Przegląd odpowiednich warunków testu biologicznego przedstawiono w dodatku 2. Badanie zwykle rozpoczyna się od pobrania próbki ryb z populacji w okresie tarła; nie należy wykorzystywać starzejących się zwierząt. Wytyczne dotyczące wieku ryb i stanu reprodukcyjnego podano w części dotyczącej wyboru ryb. Badanie przeprowadza się z zastosowaniem trzech stężeń ekspozycyjnych, jak również próby kontrolnej z wodą oraz, w razie potrzeby, próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem. W przypadku danio pręgowanego stosuje się dwa naczynia lub kontrpróby na zabieg (każde naczynie zawiera 5 samców i 5 samic). W przypadku strzebli wielkogłowej stosuje się cztery naczynia lub kontrpróby na zabieg (każde naczynie zawiera 2 samce i 4 samice). Służy to odzwierciedleniu zachowania terytorialnego samców strzebli wielkogłowej, przy równoczesnym utrzymaniu wystarczającej mocy testu. W przypadku ryżanki stosuje się cztery naczynia lub kontrpróby na zabieg (każde naczynie zawiera 3 samce i 3 samice). Narażenie trwa 21 dni, a pobieranie próbek ryb odbywa się w 21. dniu narażenia. Pomiar płodności w ujęciu ilościowym przeprowadza się codziennie.

12. Po pobraniu próbek w 21. dniu wszystkie zwierzęta uśmierca się w sposób humanitarny. Drugorzędowe cechy płciowe mierzy się u strzebli wielkogłowej i ryżanki (zob. dodatek 5A i dodatek 5B); próbki krwi pobiera się w celu oznaczenia VTG u danio pręgowanego i strzebli wielkogłowej, ewentualnie można pobrać głowę/ogon w celu oznaczenia VTG u danio pręgowanego (dodatek 6); w celu analizy VTG u ryżanki pobiera się wątrobę (dodatek 6); gonady utrwala się w całości albo poddaje się je sekcji na potrzeby ewentualnej analizy histopatologicznej (22).

KRYTERIA DOPUSZCZALNOŚCI BADANIA

13. Aby wyniki badania były dopuszczalne, muszą zostać spełnione następujące warunki:

— upadkowość w próbach kontrolnych z wodą (lub rozpuszczalnikiem) nie powinna przekraczać 10 procent na koniec okresu narażenia;

— stężenie rozpuszczonego tlenu powinno wynosić co najmniej 60 procent wartości nasycenia powietrzem (ASV) w trakcie okresu narażenia;

— różnica temperatury wody między naczyniami badawczymi przez cały okres narażenia nie może być większa niż ± 1,5 °C i musi być utrzymywana w obrębie 2 °C w zakresie temperatur określonym w odniesieniu do gatunku doświadczalnego (dodatek 2);

— powinny być dostępne dowody pozwalające wykazać, że stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze utrzymano w granicach ± 20 % średnich wartości pomiarowych;

▼M7

— powinny być dostępne dowody świadczące o aktywnym wylęgu we wszystkich kontrpróbach przed narażeniem na działanie substancji chemicznej oraz w kontrpróbach kontrolnych w trakcie badania.

OPIS METODY

Aparatura

14. Zwykły sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

a) mierniki tlenu i pehametry;

b) sprzęt do oznaczania twardości i zasadowości wody;

c) odpowiednia aparatura do pomiaru temperatury, zalecane jest stałe monitorowanie;

d) zbiorniki wykonane z chemicznie obojętnego materiału o odpowiedniej objętości w zależności od zalecanego obciążenia i obsady (zob. dodatek 2);

e) podłoże tarłowe dla strzebli wielkogłowej i danio pręgowanego, niezbędne informacje szczegółowe podano w dodatku 4;

f) waga o odpowiedniej dokładności (tj. dokładności do ± 0,5 mg).

Woda

15. Badanie można przeprowadzić w każdej wodzie, w której gatunki doświadczalne wykazują odpowiednie długoterminowe przeżycie i wzrost. Powinna mieć ona stałą jakość w okresie trwania badania. Wartość pH wody powinna mieścić się w zakresie 6,5–8,5, lecz w trakcie danego badania powinna wynosić ± 0,5 jednostek pH. Aby upewnić się, że woda rozcieńczająca nie będzie wpływała zbytnio na wyniki badania (np. na skutek kompleksowania badanej substancji chemicznej), należy okresowo pobierać próbki wody do analizy. Jeżeli wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, należy dokonywać pomiaru, np. co trzy miesiące, zawartości metali ciężkich (np. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} i SO_4^{2-}), pestycydów (np. całkowitej zawartości pestycydów fosforoorganicznych i chloroorganicznych), całkowitego węgla organicznego i zawiesiny. Jeśli można wykazać, że jakość wody była stała przez co najmniej rok, oznaczeń można dokonywać rzadziej i w większych odstępach czasu (np. co sześć miesięcy). Niektóre właściwości chemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej wymieniono w dodatku 3.

Roztwory do badań

16. Roztwory do badań o wybranych stężeniach przygotowuje się przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Zalecane jest przygotowanie roztworu podstawowego przez zwykłe wymieszanie lub zbełtanie badanej substancji chemicznej w wodzie rozcieńczającej w sposób mechaniczny (np. za pomocą mieszadła lub ultradźwięków). Kolumny nasyceniowe (rozpuszczające) stosuje się w celu uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Nie zaleca się stosowania nośnika rozpuszczalnikowego. W przypadku gdy rozpuszczalnik jest niezbędny, należy równolegle przeprowadzić próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem w tym samym stężeniu rozpuszczalnika, które zastosowano przy podaniach substancji chemicznej. W przypadku substancji chemicznych, których badanie nastręcza trudności, rozpuszczalnik możne stanowić najlepsze rozwiązanie z technicznego punktu widzenia; należy zapoznać się z wytyczną OECD „Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures” (23). Wybór rozpuszczalnika będzie uwarunkowany właściwościami chemicznymi danej substancji lub mieszaniny. W wytycznych OECD zaleca się maksymalne stężenie 100 µl/l, które należy zachować. W ostatnim przeglądzie (24) podkreślono jednak dodatkowe obawy związane ze stosowaniem rozpuszczalników do badania funkcjonowania układu hormonalnego. W związku z tym zaleca się, aby w razie konieczności minimalizować stężenie rozpuszczalnika, jeżeli tylko jest to technicznie wykonalne (w zależności od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej).

▼M7

17. Zastosowany zostanie przepływowy układ badawczy. System taki ciągle dozuje i rozcieńcza roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej (np. pompa dozująca, rozcieńczalnik proporcjonalny, układ nasycalnika) do przesyłania szeregu stężeń do komór badawczych. W trakcie badania należy okresowo, najlepiej codziennie, sprawdzać natężenia przepływu roztworów podstawowych i wody rozcieńczającej, które przez cały czas trwania badania nie powinny różnić się o więcej niż 10 %. Należy starać się unikać stosowania rur z tworzywa sztucznego niskiej klasy lub innych materiałów, które mogą zwierać aktywne biologicznie substancje chemiczne. Podczas selekcji materiału do przepływowego układu badawczego należy rozważyć możliwą adsorpcję badanej substancji chemicznej do danego materiału.

Utrzymywanie ryb

18. Ryby doświadczalne należy wybrać z populacji laboratoryjnej, najlepiej z jednego stada, które przez co najmniej dwa tygodnie przed badaniem było aklimatyzowane w warunkach jakości wody i oświetlenia zbliżonych do stosowanych w badaniu. Ważne jest, aby wskaźnik obciążenia i obsada (definicje można znaleźć w dodatku 1) były odpowiednie dla gatunków doświadczalnych (zob dodatek 2).

19. Po 48-godzinnym okresie adaptacji odnotowuje się upadkowość i zastosowanie mają następujące kryteria:

— upadkowość przekracza 10 % populacji w ciągu siedmiu dni: należy odrzucić całą partię;

— upadkowość na poziomie 5–10 % populacji: aklimatyzacja przez siedem dodatkowych dni; jeżeli upadkowość przekroczy 5 % w ciągu tych kolejnych siedmiu dni, należy odrzucić całą partię;

— upadkowość mniejsza niż 5 % populacji w ciągu siedmiu dni: dopuścić partię.

20. Ryby nie powinny być leczone na żadną chorobę w okresie aklimatyzacji, w okresie poprzedzającym narażenie ani w okresie narażenia.

Okres poprzedzający narażenie i wybór ryb

21. Zaleca się tygodniowy lub dwutygodniowy okres poprzedzający narażenie, w którym zwierzęta umieszcza się w naczyniach podobnych do faktycznych naczyń użytych do badania. Ryby należy karmić *bez ograniczeń* przez cały okres trzymania i na etapie narażenia. Etap narażenia rozpoczyna się z wykorzystaniem dymorficznych płciowo dorosłych ryb z laboratoryjnego źródła zwierząt dojrzałych płciowo (np. o wyraźnych drugorzędowych cechach płciowych widocznych w przypadku strzebli wielkogłowej i ryżanki), które wykazują aktywność tarłową. Zgodnie z ogólną wytyczną (której nie należy stosować w oderwaniu od obserwacji rzeczywistego stanu reprodukcyjnego danej partii ryb) strzebli wielkogłowe powinny być w wieku około 20 tygodni (± 2 tygodnie), zakładając, że były hodowane w temperaturze 25 ± 2 °C przez całą długość życia. Ryżanki japońskie powinny być w wieku około 16 tygodni (± 2 tygodnie), zakładając, że były hodowane w temperaturze 25 ± 2 °C przez całą długość życia. Danio pręgowane powinny być w wieku około 16 tygodni (± 2 tygodnie), zakładając, że były hodowane w temperaturze 26 ± 2 °C przez całą długość życia. Ocenę wytwarzania jaj powinno się przeprowadzać na etapie poprzedzającym narażenie na działanie substancji. Zaleca się obserwację tarła we wszystkich zbiornikach z kontrpróbą przed włączeniem go do etapu badania, na którym następuje narażenie na działanie substancji. Na tym etapie orientacyjne ustalenie pożądanej liczby jaj, jaka powinna zostać wytworzona każdego dnia, nie jest możliwe, ale z ogólnych obserwacji można wywnioskować, że średnia liczba jaj jest większa niż 10 jaj na samicę dziennie dla poszczególnych gatunków. Aby zapewnić równomierny rozkład kontrprób, przy przypisywaniu kontrprób do poszczególnych poziomów doświadczalnych należy stosować układ bloków losowanych sporządzony w oparciu o dane dotyczące wytwarzania jaj.

▼M7

PLAN BADANIA

22. Stosuje się trzy stężenia badanej substancji chemicznej, jedną próbę kontrolną (z wodą) i, w razie potrzeby, jedną próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem. Dane można analizować w celu określenia statystycznie istotnych różnic między reakcjami w grupie badanej i grupie kontrolnej. Analizy te dostarczą informacji, czy wymagane jest dalsze długoterminowe badanie substancji chemicznej pod kątem działania niepożądanego (mianowicie wpływu na przeżycie, rozwój, wzrost i rozrodczość), czy też badanie takie ma służyć do wykorzystania w ocenie ryzyka (25).

23. W przypadku danio pręgowanego w 21. dniu doświadczenia pobiera się próbkę samców i samic z każdej grupy poddanej działaniu substancji chemicznej o określonym stężeniu (5 samców i 5 samic z każdej z dwóch kontrprób) i z grup kontrolnych w celu dokonania pomiaru witellogeniny. W przypadku ryżanki w 21. dniu doświadczenia pobiera się próbkę samców i samic z każdej grupy poddanej działaniu substancji chemicznej o określonym stężeniu (3 samców i 3 samic z każdej z dwóch kontrprób) i z grup kontrolnych w celu dokonania pomiaru witellogeniny i, w stosownych przypadkach, drugorzędowych cech płciowych. W przypadku strzebli wielkogłowej w 21. dniu narażenia pobiera się próbkę samców i samic (2 samce i 4 samice z każdej z czterech kontrprób i z grup kontrolnych) w celu dokonania pomiaru witellogeniny i drugorzędowych cech płciowych. Należy przeprowadzić ilościową ocenę płodności, przy czym w stosownych przypadkach należy utrwalić tkanki gonad w całości lub poddać je sekcji do celów ewentualnej oceny histopatologicznej.

Dobór badanych stężeń

24. Do celów niniejszego badania najwyższym badanym stężeniem substancji chemicznej powinna być wartość maksymalnego tolerowanego stężenia wyznaczonego w badaniu ustalającym zakres lub za pomocą innych danych dotyczących toksyczności, 10 mg/l albo wartość maksymalnej rozpuszczalności w wodzie, w zależności od tego, która wartość jest najniższa. Maksymalne tolerowane stężenie definiuje się jako najwyższe badane stężenie substancji chemicznej, którego skutkiem jest upadkowość na poziomie poniżej 10 %. Przy zastosowaniu tego podejścia zakłada się istnienie empirycznych danych dotyczących przypadków ostrej toksyczności lub innych danych dotyczących toksyczności, na podstawie których można oszacować maksymalne tolerowane stężenie. Oszacowanie MTC może być niedokładne i zazwyczaj wymaga jeszcze oceny specjalistów.

25. Wymagane są trzy badane stężenia, które różnią się o taką samą wielokrotność nieprzekraczającą 10, oraz próba kontrolna z wodą rozcieńczającą (oraz, w razie potrzeby, z rozpuszczalnikiem). Zaleca się krotność odstępu wynoszącą od 3,2 do 10.

PROCEDURA

Wybór i ważenie ryb doświadczalnych

26. Istotne jest, aby zminimalizować zmienność masy ryb na początku badania. Odpowiedni zakres wielkości dla różnych gatunków zalecanych do wykorzystania w tym badaniu podano w dodatku 2. W odniesieniu do całej partii ryb wykorzystanych w badaniu zakres poszczególnych mas samców i samic ryb na początku badania należy w miarę możliwości utrzymać w zakresie ± 20 % średniej arytmetycznej masy dla tej samej płci. Zaleca się zważenie podpróbki ze stada ryb przed rozpoczęciem badania w celu oszacowania średniej masy.

Warunki narażenia na działanie substancji

Czas trwania

27. Czas trwania badania, następujący po okresie poprzedzającym narażenie, wynosi 21 dni. Zalecany okres poprzedzający narażenie wynosi dwa tygodnie.

Karmienie

28. Ryby należy karmić *bez ograniczeń*, podając odpowiedni pokarm (dodatek 2), w porcjach wystarczających do utrzymania stanu zdrowia. Należy dołożyć starań, aby zapobiec rozwojowi mikroorganizmów i mętności wody.

▼M7

Zgodnie z ogólną wytyczną dzienną dawkę pokarmową można podzielić na dwie lub trzy równe porcje podawane w kilku posiłkach dziennie w odstępach co najmniej trzech godzin między poszczególnymi posiłkami. Dopuszczalna jest jedna większa dawka, w szczególności w weekendy. Karmienia ryb należy zaprzestać na 12 godzin przed pobraniem próbek/sekcją.

29. Paszę dla ryb należy ocenić pod kątem obecności zanieczyszczeń takich jak pestycydy chloroorganiczne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), polichlorowane bifenyle (PCB). Należy unikać pokarmów o podwyższonej zawartości fitoestrogenów, które mogłyby wypaczyć reakcję w trakcie badania na znanego agonistę estrogenu (np. 17b-estradiol).

30. Niespożyty pokarm i odchody należy usuwać z naczyń badawczych co najmniej dwa razy w tygodniu, np. ostrożnie czyszcząc dno każdego zbiornika za pomocą syfonu.

Światło i temperatura

31. Fotoperiod i temperatura wody powinny być odpowiednie dla gatunku doświadczalnego (zob. dodatek 2).

Częstotliwość oznaczeń i pomiarów analitycznych

32. Przed rozpoczęciem okresu narażenia należy upewnić się, że system podawania substancji chemicznej działa prawidłowo. Należy ustalić wszystkie potrzebne metody analityczne, w tym zgromadzić dostateczną wiedzę na temat stabilności chemicznej układu badawczego. W trakcie badania stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w regularnych odstępach czasu w następujący sposób: natężenia przepływu rozcieńczalnika i roztworu podstawowego substancji toksycznej należy sprawdzać najlepiej codziennie, a co najmniej dwa razy na tydzień, przy czym nie powinny one różnić się o więcej niż 10 % przez cały czas trwania badania. Zaleca się, aby faktyczne stężenia badanej substancji chemicznej mierzyć we wszystkich naczyniach na początku badania, a następnie w odstępach tygodniowych.

33. Zaleca się, aby wyniki były oparte na mierzonych stężeniach. Jeżeli jednak stężenie badanej substancji chemicznej w roztworze można z powodzeniem utrzymywać w zakresie ± 20 % stężenia nominalnego przez cały czas trwania badania, wówczas wyniki mogą opierać się albo na wartościach nominalnych, albo na wartościach pomiarowych.

34. Próbki mogą wymagać przefiltrowania (np. przez filtr z porami o średnicy 0,45 μm) lub odwirowania. Jeżeli jest to konieczne, wówczas zalecaną procedurą jest odwirowanie. Jeżeli jednak badany materiał nie ulega adsorpcji na filtrze, dopuszczalna jest też filtracja.

35. Podczas badania we wszystkich naczyniach badawczych co najmniej raz na tydzień należy zmierzyć stężenie rozpuszczonego tlenu, temperaturę i pH. Całkowitą twardość i zasadowość należy mierzyć w próbach kontrolnych i w jednym naczyniu przy najwyższym stężeniu co najmniej raz na tydzień. Zalecane jest stałe monitorowanie temperatury w co najmniej jednym naczyniu badawczym.

Obserwacje

36. W czasie trwania badania albo po jego zakończeniu ocenia się szereg reakcji ogólnych (np. przeżycie) i reakcji biologicznych (np. poziomy VTG). Należy codziennie monitorować płodność w ujęciu ilościowym. Procedurę pomiaru i oceny tych punktów końcowych i ich przydatność opisano poniżej.

Przeżycie

37. W okresie badania ryby należy badać codziennie i odnotowywać wszelkie przypadki śmiertelne, zaś martwe ryby należy jak najszybciej usuwać. Martwych ryb nie należy zastępować ani w naczyniu kontrolnym, ani w naczyniu z badaną substancją. Płeć ryb, które umierają w trakcie badania, należy ustalić poprzez makroskopową ocenę gonad.

▼M7

Zachowanie i wygląd

38. Należy odnotować wszelkie przypadki nietypowego zachowania (w porównaniu z grupami kontrolnymi), które mogą obejmować oznaki ogólnej toksyczności, w tym hiperwentylację, nieskoordynowane pływanie, utratę równowagi i nietypowy spokój lub żerowanie. Dodatkowo należy odnotować anomalie zewnętrzne (takie jak krwotok, sinica). Do takich oznak toksyczności należy podchodzić ostrożnie podczas interpretacji danych, ponieważ mogą one wskazywać na stężenia, przy których biomarkery aktywności hormonalnej nie są wiarygodne. Takie obserwacje zachowania mogą również dostarczyć przydatnych informacji jakościowych na potrzeby potencjalnych przyszłych wymogów dotyczących badań ryb. Na przykład zaobserwowano agresję terytorialną u normalnych samców lub zmaskulinizowanych samic strzebli wielkogłowej po narażeniu na substancję o działaniu androgennym; u danio pręgowanego charakterystyczne zachowania związane z kryciem i tarłem po pojawieniu się światła o brzasku ulegają ograniczeniu lub zmniejszeniu wskutek narażenia na substancje o działaniu estrogennym i antyandrogennym.

39. Ponieważ niektóre aspekty wyglądu (przede wszystkim zabarwienie) mogą zmieniać się szybko w zależności od sposobu postępowania, ważne jest, aby obserwacji jakościowych dokonywać przed usunięciem zwierząt z układu badawczego. Jak wynika z dotychczasowych doświadczeń ze strzeblami wielkogłowymi, niektóre substancje chemiczne zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego mogą początkowo wywoływać zmiany w następujących cechach zewnętrznych: zabarwieniu ciała (jasne albo ciemne), wzorze zabarwienia (występowanie pionowych pręg) i kształcie ciała (głowa i obszar piersiowy). Dlatego też wygląd fizyczny ryb należy obserwować w trakcie badania i po jego zakończeniu.

Płodność

40. Rezultaty codziennych obserwacji ilościowych tarła powinny być zapisywane dla poszczególnych kontrprób. Dane dotyczące wytwarzania jaj powinny być zapisywane dla poszczególnych kontrprób w następującym formacie: liczba jaj / żywą samicę / dzień. Jaja będą codziennie usuwane z komór badawczych. W przypadku strzebli wielkogłowej i danio pręgowanego podłoża tarłowe powinny zostać umieszczone w komorze badawczej, aby zapewnić rybom możliwość tarła w normalnych warunkach. W dodatku 4 przedstawiono dalsze szczegółowe informacje na temat zalecanych podłoży tarłowych dla danio pręgowanego (dodatek 4A) i strzebli wielkogłowej (dodatek 4B). Zapewnienie podłoża tarłowego dla ryżanki nie jest konieczne.

Humanitarne uśmiercanie ryb

41. W 21. dniu, tj. po zakończeniu narażenia, ryby należy uśmiercić, podając im odpowiednie ilości tricainy (MS-222) (CAS 886-86-2) 100-500 mg/l buforowanej 300 mg/l $NaHCO_3$ (wodorowęglanu sodu, CAS 144-55-8) w celu ograniczenia podrażnienia błon śluzowych; następnie pobiera się próbki krwi lub tkanek w celu oznaczenia witellogeniny, jak wyjaśniono w części dotyczącej witellogeniny.

Obserwacja drugorzędowych cech płciowych

42. Niektóre substancje chemiczne zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego mogą wywoływać zmiany w wyspecjalizowanych drugorzędowych cechach płciowych (liczbie guzków godowych u strzebli wielkogłowej, procesie tworzenia się brodawek u samców ryżanki). Zwłaszcza substancje chemiczne o określonym charakterze działania mogą powodować nietypowe pojawianie się drugorzędowych cech płciowych u zwierząt przeciwnej płci; na przykład substancje będące agonistami receptorów androgenowych, takie jak trenbolon, metylotestosteron i dihydrotestosteron, mogą spowodować powstawanie u samic strzebli wielkogłowej widocznych guzków godowych lub tworzenie się brodawek u samic ryżanki (11, 20, 21). Odnotowano również, że agonisty receptorów estrogenowych mogą zmniejszać liczebność

▼M7

guzków godowych i wielkość wyściółki tłuszczowej na grzbiecie u dorosłych samców strzebli wielkogłowej (26, 27). Takie całościowe obserwacje morfologiczne mogą również dostarczyć przydatnych informacji ilościowych i jakościowych na potrzeby potencjalnych przyszłych wymogów dotyczących badań ryb. Liczbę i wielkość guzków godowych u strzebli wielkogłowej i procesów tworzenia się brodawek u ryżanki można określić ilościowo bezpośrednio albo, co jest bardziej praktycznym sposobem, u utrwalonych okazów. Zalecane procedury oceny drugorzędowych cech płciowych u strzebli wielkogłowej i ryżanki znaleźć odpowiednio w dodatkach 5A i 5B.

Witellogenina (VTG)

43. Krew pobiera się z tętnicy/żyły ogonowej za pomocą kapilary mikrohematokrytowej powlekanej heparyną lub ewentualnie przez nakłucie serca za pomocą strzykawki. W zależności od wielkości ryby objętość krwi, jaką można pobrać, wynosi zwykle 5–60 µl na osobnika w przypadku strzebli wielkogłowej i 5–15 µl na osobnika w przypadku danio pręgowanego. Osocze oddziela się od krwi przez odwirowanie i przechowuje z inhibitorami proteaz w temperaturze -80 °C do czasu przeprowadzenia analizy pod kątem VTG. Alternatywnym źródłem tkanki do oznaczenia VTG u ryżanki będzie wątroba, zaś u danio pręgowanego można wykorzystać homogenat głowy/ogona (dodatek 6). Pomiar VTG powinien opierać się na zweryfikowanej homologicznej metodzie ELISA, w której wykorzystuje się homologiczną normę VTG i homologiczne przeciwciała. Zaleca się stosowanie metody pozwalającej na wykrycie poziomów VTG wynoszących zaledwie kilka ng/ml osocza (lub ng/ml tkanki), co stanowi poziom tła w przypadku samców ryb nienarażonych na działanie substancji.

44. Kontrola jakości analizy poziomu VTG zostanie przeprowadzona z wykorzystaniem norm, prób ślepych i przynajmniej analiz powtórnych. W przypadku każdej metody ELISA należy przeprowadzić test na wpływ matrycy (wpływ rozcieńczenia próbki) w celu oznaczenia minimalnego współczynnika rozcieńczenia próbki. Każda płytka do testu ELISA wykorzystana do badań VTG powinna zawierać następujące próbki kontroli jakości: co najmniej 6 wzorców kalibracyjnych obejmujących zakres oczekiwanych stężeń VTG i co najmniej jedną niespecyficzną, wiążącą próbę ślepą badania (poddawaną analizom powtórnym). Absorbancja tych prób ślepych powinna wynosić poniżej 5 % maksymalnej absorbancji wzorca kalibracyjnego. Analizę przeprowadza się dla co najmniej dwóch podwielokrotności (zduplikowane dołki) każdej rozcieńczonej próbki. Zduplikowane dołki, które różnią się o więcej niż 20 %, należy poddać ponownej analizie.

45. Współczynnik korelacji (R^2) w przypadku krzywych wzorcowych powinien być wyższy niż 0,99. Wysoka korelacja nie jest jednak wystarczająca, aby zagwarantować odpowiednią prognozę stężenia we wszystkich zakresach. Oprócz wystarczająco wysokiej korelacji dla krzywej wzorcowej stężenie każdego wzorca, obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej, powinno mieścić się w przedziale 70–120 % stężenia nominalnego. Jeżeli stężenia nominalne oddalają się od kalibracyjnej linii regresji (np. przy niższych stężeniach), konieczny może być podział krzywej wzorcowej na zakresy niskie i wysokie lub zastosowanie modelu nieliniowego, aby odpowiednio dopasować dane dotyczące absorbancji. Jeżeli krzywa zostanie podzielona, oba odcinki linii powinny mieć R^2 >0,99.

46. Granicę wykrywalności definiuje się jako najniższe stężenie wzorca analitycznego, a granicę oznaczalności definiuje się jako najniższe stężenie wzorca analitycznego pomnożone przez najniższy współczynnik rozcieńczenia.

47. Każdego dnia, w którym przeprowadza się badania VTG, analizie zostanie poddana próbka wzmocniona przygotowana z zastosowaniem międzylaboratoryjnego wzorca referencyjnego (dodatek 7). Stosunek oczekiwanego stężenia do zmierzonego stężenia zostanie odnotowany wraz z wynikami każdego zbioru badań przeprowadzonych w danym dniu.

Ocena badania histopatologicznego gonad

48. Organy regulacyjne mogą ustanowić wymóg przeprowadzenia badania histopatologicznego gonad w celu zbadania organu docelowego wzdłuż osi podwzgórze-przysadka-gonady po narażeniu na działanie substancji chemicznej. W tym względzie gonady utrwala się wraz z resztą ciała albo wycina się je. W przypadku konieczności przeprowadzenia badania histopatologicznego w ramach oceny wpływu badanej substancji chemicznej na układ hormonalny poszukuje się konkretnych związanych z układem hormonalnym

▼M7

reakcji odnotowywanych w gonadach. Wspomniane reakcje diagnostyczne zasadniczo obejmują występowanie oocytów androgennych, hiperplazję komórek Leydiga, obniżenie sprawności żółtka, wzrost liczby spermatogoniów i hiperplazję folikulinową. Inne zmiany patologiczne gonad, takie jak atrezja oocytów, degeneracja jąder oraz zmiany cyklu, mogą mieć różne przyczyny. W wytycznych dotyczących histopatologii gonad ryb określono procedury, jakie należy stosować przy wycinaniu, utrwalaniu i sekcji gonad oraz przy przeprowadzaniu oceny histopatologicznej gonad (22).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena reakcji biomarkerów za pomocą analizy wariancji (ANOVA)

49. W celu zidentyfikowania potencjalnego działania substancji chemicznej porównuje się reakcje grup badanych i grup kontrolnych z zastosowaniem analizy wariancji (ANOVA). W przypadku wykorzystania próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem należy przeprowadzić odpowiedni test statystyczny dla próby kontrolnej z wodą rozcieńczającą i próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem w odniesieniu do każdego punktu końcowego. Wytyczne dotyczące wykorzystania danych dotyczących kontroli z wodą rozcieńczającą i kontroli z rozpuszczalnikiem w późniejszej analizie statystycznej można znaleźć w OECD, 2006c (28). Wszystkie dane na temat reakcji biologicznej należy analizować i odnotowywać oddzielnie dla każdej płci. Jeśli wymagane założenia dotyczące metod parametrycznych nie zostaną spełnione – rozkład nienormalny (np. test Shapiro-Wilka) lub niejednorodna wariancja (test Bartletta lub Levene'a), należy rozważyć przekształcenie danych w celu ujednorodnienia wariancji przed przeprowadzeniem ANOVA lub ważonej ANOVA. W przypadku niemonotonicznej zależności dawka-odpowiedź można zastosować test Dunnetta (parametryczny) wielokrotnych porównań w parach lub test Manna-Whitneya z korektą Bonferroniego (nieparametryczny). Inne testy statystyczne (np. test Jonckheere'a-Terpstry lub test Williamsa) można zastosować, jeżeli zależność dawka-odpowiedź jest w przybliżeniu monotoniczna. W dodatku 8 przedstawiono schemat statystyczny, który ma pomóc w wyborze najodpowiedniejszego testu statystycznego. Dodatkowe informacje można również znaleźć w dokumencie OECD „Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data” (28).

Sprawozdawczość w zakresie wyników testów

50. Dane dotyczące badania powinny obejmować poniższe informacje.

Placówka badawcza:

— szczegółowe informacje na temat odpowiedzialnych pracowników i ich obowiązków w zakresie badań;

— każde laboratorium powinno wykazać się biegłością w stosowaniu szeregu reprezentatywnych substancji chemicznych.

Badana substancja chemiczna:

— charakterystyka badanej substancji chemicznej;

— właściwości fizyczne i stosowne właściwości fizykochemiczne;

— metody i częstotliwości przygotowywania badanych stężeń;

— informacje dotyczące stabilności i biodegradowalności.

Rozpuszczalnik:

— charakterystyka rozpuszczalnika (charakter, wykorzystane stężenie);

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika (jeśli jest inny niż woda).

▼M7

Zwierzęta doświadczalne:

— gatunek i szczep;

— dostawca i określony zakład dostawcy;

— wiek ryb na początku badania i stan reprodukcyjny/okres tarła;

— szczegóły dotyczące procedur aklimatyzacji zwierząt;

— masa ciała ryb na początku okresu narażenia (na podstawie podpróbki ze stada ryb).

Warunki badania:

— zastosowana procedura badawcza (rodzaj badania, wskaźnik obciążenia, obsada itd.);

— metoda przygotowania roztworów podstawowych i natężenie przepływu;

— badane stężenia nominalne, mierzone cotygodniowo stężenia roztworów do badań i zastosowana metoda analityczna, średnie wartości pomiarowych oraz odchylenia standardowe w naczyniach badawczych, a także dowody świadczące o tym, że pomiary odnoszą się do stężeń badanej substancji chemicznej w rzeczywistym roztworze;

— charakterystyka wody rozcieńczającej (w tym pH, twardość, zasadowość, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom chloru resztkowego, całkowity węgiel organiczny, zawiesina i wszelkie inne wykonane pomiary);

— Jakość wody w naczyniach badawczych: pH, twardość, temperatura i stężenie rozpuszczonego tlenu;

— szczegółowe informacje dotyczące karmienia (np. rodzaj pokarmu, źródło, podana ilość i częstotliwość podawania oraz analiza pod kątem odpowiednich zanieczyszczeń (np. PCB, WWA oraz pestycydów chloroorganicznych), jeżeli jest dostępna).

Wyniki

— dowody świadczące o tym, że próby kontrolne spełniają kryteria dopuszczalności badania;

— dane na temat upadkowości w dowolnym z badanych stężeń i prób kontrolnych;

— zastosowane techniki statystyczno-analityczne, przetwarzanie danych i uzasadnienie zastosowanych technik;

— dane dotyczące biologicznych obserwacji morfologii makroskopowej, z uwzględnieniem drugorzędowych cech płciowych, wytwarzania jaj i VTG;

— wyniki analiz danych, przedstawione najlepiej w formie tabelarycznej i graficznej;

— przypadki wszystkich nietypowych reakcji ryb i wszystkie widoczne efekty spowodowane przez badaną substancję chemiczną.

▼M7

WYTYCZNE DOTYCZĄCE INTERPRETACJI I AKCEPTACJI WYNIKÓW BADANIA

51. W niniejszej części przedstawiono kilka kwestii, które należy uwzględnić przy interpretacji wyników badania w odniesieniu do różnych zmierzonych punktów końcowych. Wyniki te należy interpretować ostrożnie, ilekroć wydaje się, że badana substancja chemiczna powoduje widoczną toksyczność lub wpływa na ogólny stan zwierzęcia doświadczalnego.

52. Ustalając zakres badanych stężeń, należy dołożyć starań, aby nie przekroczyć maksymalnego tolerowanego stężenia i umożliwić wymierną interpretację danych. Ważne jest, aby otrzymać co najmniej jedną próbę poddaną narażeniu, w której nie ma oznak skutków toksycznych. Oznaki choroby i skutków toksycznych należy dokładnie ocenić i odnotować. Możliwe jest na przykład, że na wytwarzanie VTG u samic mogą również wpływać ogólna toksyczność i niehormonalne sposoby działania toksycznego, np. hepatotoksyczność. Interpretację skutków mogą jednak wzmocnić inne poziomy zabiegu, które nie są zakłócone przez toksyczność ogólnoustrojową.

53. Istnieje kilka aspektów, które należy rozważyć do celów akceptacji wyników badania. Jako wytyczną można przyjąć, że poziomy VTG w grupach kontrolnych samców i samic powinny być odmienne i powinny się różnić o około trzy rzędy wielkości w przypadku strzebli wielkogłowej i danio pręgowanego oraz o około jeden rząd wielkości w przypadku ryżanki. Przykłady zakresu wartości osiąganych w grupach kontrolnych i badanych są dostępne w sprawozdaniach z weryfikacji (1, 2, 3, 4). Wysokie wartości VTG u samców w grupie kontrolnej mogą zakłócić czułość badania i jego zdolność do wykrywania słabych agonistów estrogenu. Niskie wartości VTG u samic w próbie kontrolnej mogą zakłócić czułość badania i jego zdolność do wykrywania inhibitorów aromatazy i agonistów estrogenu. Do opracowania tej wytycznej wykorzystano badania weryfikacyjne.

54. Jeżeli chodzi o ilościowy pomiar wytwarzania jaj, wskaźnik ten podlega istotnym wahaniom (wartość współczynnika zmienności (CV) może wahać się między 20 % a 60 %), co niekorzystnie odbija się na możliwości wykrycia znacznego spadku ilości wytwarzanych jaj, w przypadku gdy ilość ta jest mniejsza niż 70 %, w miarę jak wartość CV zbliża się do 50 % lub przekracza ten poziom. Jeżeli wartość CV utrzymuje się na niższym poziomie (około 20–30 %), uznaje się, że moc badania jest wystarczająca (80 %) do tego, by wykryć spadek liczby wytwarzanych jaj o 40–50 %. Plan badania stosowany w przypadku strzebli wielkogłowej, zgodnie z którym każdy poziom stężenia substancji bada się w zestawieniu z czterema podpróbami, powinien przyczynić się do zwiększenia mocy punktu końcowego dotyczącego płodności w porównaniu z planem badania zakładającym wykorzystanie zaledwie dwóch kontrprób.

55. Jeżeli laboratorium nie przeprowadzało jeszcze takiego badania albo wprowadzono istotne zmiany w badaniu (takie jak zmiana gatunku lub dostawcy ryb), zaleca się przeprowadzenie badania biegłości technicznej. Zaleca się stosowanie substancji chemicznych, które obejmują szereg sposobów działania lub wpływają na wiele punktów końcowych badania. W praktyce zachęca się każde laboratorium do zgromadzenia własnych danych historycznych dotyczących kontroli w odniesieniu do samców i samic oraz do przeprowadzenia kontroli dodatniej pod kątem działania estrogennego (np. 17β-estradiolu w stężeniu 100 ng/l lub znanego słabego agonisty), które prowadzi do podwyższenia poziomu VTG u samców ryb, kontroli dodatniej pod kątem inhibicji aromatazy (np. fadrozolu lub prochlorazu w stężeniu 300 µg/l), które prowadzi do zmniejszenia poziomu VTG u samic ryb, oraz kontroli dodatniej pod kątem działania androgennego (np. 17β-trenbolonu w stężeniu 5 µg/l), które prowadzi do wykształcenia drugorzędowych cech płciowych u strzebli wielkogłowej i ryżanki. Aby zapewnić biegłość laboratorium, wszystkie te dane można porównać z danymi dostępnymi z badań walidacyjnych (1, 2, 3).

56. Zasadniczo pomiary VTG należy uznać za dodatnie, jeżeli występuje statystycznie istotny wzrost poziomu VTG u samców ($p < 0,05$) lub statystycznie istotny spadek poziomu u samic ($p < 0,05$) przynajmniej przy najwyższej badanej dawce w porównaniu z grupą kontrolną i przy braku oznak ogólnej

▼M7

toksyczności. Wynik dodatni jest poparty ponadto wykazaniem biologicznie wiarygodnej zależności między dawką i krzywą odpowiedzi. Jak już wspomniano, spadek poziomu VTG może nie mieć wyłącznie hormonalnego pochodzenia; wynik dodatni należy jednak zasadniczo interpretować jako dowód na działanie zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego *in vivo* i powinien on zwykle inicjować podjęcie działań w celu dalszego wyjaśnienia.

57. Organy regulacyjne mogą ustanowić obowiązek przeprowadzenia analizy histopatologicznej gonad, aby ocenić sprawność rozrodczą zwierząt doświadczalnych i aby zapewnić możliwość ocenienia wagi dowodów wyników badania. Przeprowadzenie badania histopatologicznego gonad może nie być konieczne w przypadku uzyskania dodatniego wyniku VTG albo dodatniego wyniku w odniesieniu do drugorzędowych cech płciowych (tj. wzrost lub spadek VTG lub indukcja drugorzędowych cech płciowych).

BIBLIOGRAFIA

(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). Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 60, Paryż.

(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). Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 61, Paryż.

(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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 78, Paryż.

(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 (data uzyskania dostępu: 18/09/08).

(5) Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 grudnia 2007 r. Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych, Waszyngton DC. 104 s.

(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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 94, Paryż.

(7) Sumpter J.P. i S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 supl. 7, s. 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), s. 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), s. 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), s. 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), s. 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), s. 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 odniesienie do raportu z badania AQ001. CEFIC, Bruksela, Belgia.

(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), s. 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, s. 119–131.

(16) Surralles, J. *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C 131, s. 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; t. 21, s. 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, s. 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, s. 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), s. 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), s. 774–81.

(22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 123, Paryż.

(23) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa. Seria dotycząca badań i oceny. Nr 23. Paryż.

(24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76, s. 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 suplement 1, s. 106–114.

▼**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, s. 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, s. 478–488.

(28) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 54, OECD, Paryż.

(29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, 30 stycznia 2008 r., Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych, Waszyngton DC. 110 s.

(30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 150, OECD, Paryż.

▼**M7**

Dodatek 1

SKRÓTY I DEFINICJE

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

CV: współczynnik zmienności.

ELISA: test immunoenzymatyczny.

Oś HPG: oś podwzgórze–przysadka–gonady.

Wskaźnik obciążenia: mokra masa ryb na objętość wody.

MTC: maksymalne tolerowane stężenie, stanowiące około 10 % LC_{50}.

Obsada: liczba ryb na objętość wody.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

VTG: witellogenina to fosfolipidoglikoproteinowy prekursor białek żółtka jajka występujący zwykle u aktywnych płciowo samic wszystkich gatunków jajorodnych.

▼M7

Dodatek 2

WARUNKI DOŚWIADCZALNE BADANIA PRZESIEWOWEGO UKŁADU HORMONALNEGO RYB

1. Zalecany gatunek	Strzebla wielkogłowa (*Pimephales promelas*)	Ryżanka (*Oryzias latipes*)	Danio pręgowany (*Danio rerio*)
2. Rodzaj badania	Przepływowe	Przepływowe	Przepływowe
3. Temperatura wody	25 ±2 °C	25 ±2 °C	26 ±2 °C
4. Jakość oświetlenia	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)
5. Światłość	10-20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 000 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)	10-20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 000 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)	10-20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 000 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)
6. Fotoperiod (fazy brzasku/zmierzchu są fakultatywne, nie są jednak uważane za niezbędne)	16 godzin światła, 8 godzin bez dostępu światła	12–16 h światła, 12–8 h bez dostępu światła	12–16 h światła, 12–8 h bez dostępu światła
7. Wskaźnik obciążenia	<5 g na l	<5 g na l	<5 g na l
8. Wielkość komory badawczej	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Objętość roztworu do badań	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Wymiana objętości roztworów do badań	Minimum 6 razy dziennie	Minimum 5 razy dziennie	Minimum 5 razy dziennie
11. Wiek organizmów doświadczalnych	Zob. pkt 21	Zob. pkt 21	Zob. pkt 21
12. Przybliżona mokra masa dorosłych ryb (g)	Samice: 1,5 ± 20 % Samce: 2,5 ± 20 %	Samice: 0,35 ± 20 % Samce: 0,35 ± 20 %	Samice: 0,65 ± 20 % Samce: 0,4 ± 20 %
13. Liczba ryb na naczynie badawcze	6 (2 samce i 4 samice)	6 (3 samce i 3 samice)	10 (5 samców i 5 samic)
14. Liczba zabiegów	= 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)	= 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)	= 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)
15. Liczba naczyń na zabieg	Minimum 4	Minimum 4	Minimum 2
16. Liczba ryb na badane stężenie	16 dorosłych samic i 8 samców (4 samice i 2 samce w każdym naczyniu z kontrpróbą)	12 dorosłych samic i 12 samców (3 samic i 3 samców w każdym naczyniu z kontrpróbą)	10 dorosłych samic i 10 samców (5 samic i 5 samców w każdym naczyniu z kontrpróbą)
17. Schemat żywienia	Żywe lub zamrożone dorosłe solowce lub naupliusy dwa lub trzy razy dziennie (*bez ograniczeń*), pokarm dostępny na rynku lub połączenie obu wariantów	Naupliusy solowca dwa lub trzy razy dziennie (*bez ograniczeń*), pokarm dostępny na rynku lub połączenie obu wariantów	Naupliusy solowca dwa lub trzy razy dziennie (*bez ograniczeń*), pokarm dostępny na rynku lub połączenie obu wariantów

▼M7

18. Napowietrzanie	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu (DO) nie spadnie poniżej 60 % nasycenia	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu (DO) nie spadnie poniżej 60 % nasycenia	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu (DO) nie spadnie poniżej 60 % nasycenia
19. Woda rozcieńczająca	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana lub odchlorowana woda wodociągowa	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana lub odchlorowana woda wodociągowa	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana lub odchlorowana woda wodociągowa
20. Okres poprzedzający narażenie	Zaleca się 7–14 dni	Zaleca się 7–14 dni	Zaleca się 7–14 dni
21. Czas trwania narażenia na substancję chemiczną	21 dni	21 dni	21 dni
22. Biologiczne punkty końcowe	— przeżycie — zachowanie — płodność — drugorzędowe cechy płciowe — VTG — opcjonalna histopatologia gonad	— przeżycie — zachowanie — płodność — drugorzędowe cechy płciowe — VTG — opcjonalna histopatologia gonad	— przeżycie — zachowanie — płodność — VTG — opcjonalna histopatologia gonad
23. Dopuszczalność badania	Rozpuszczony tlen ≥ 60 % nasycenia; średnia temperatura 25 ± 2 °C; 90 % przeżywalności ryb w próbach kontrolnych; zmierzone badane stężenia w granicach 20 % średnich wartości pomiarowych na każdy poziom podania substancji.	Rozpuszczony tlen ≥ 60 % nasycenia; średnia temperatura 25 ± 2 °C; 90 % przeżywalności ryb w próbach kontrolnych; zmierzone badane stężenia w granicach 20 % średnich wartości pomiarowych na każdy poziom podania substancji.	Rozpuszczony tlen ≥ 60 % nasycenia; średnia temperatura 26 ± 2 °C; 90 % przeżywalności ryb w próbach kontrolnych; zmierzone badane stężenia w granicach 20 % średnich wartości pomiarowych na każdy poziom podania substancji.

▼**M7**

Dodatek 3

NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE DOPUSZCZALNEJ WODY ROZCIEŃCZAJĄCEJ

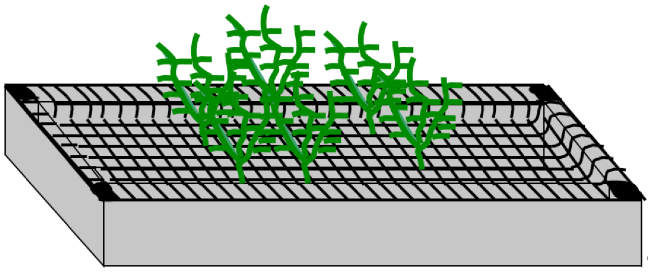
SKŁADNIK	STĘŻENIA
Cząstki stałe	<20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	<2 mg/l
Niezjonizowany amoniak	<1 µg/l
Chlor resztkowy	<10 µg/l
Pestycydy fosforoorganiczne ogółem	<50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli	<50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	<25 ng/l

▼M7

Dodatek 4A

PODŁOŻE TARŁOWE DLA DANIO PRĘGOWANEGO

Tacka na ikrę: naczynie na narzędzia w całości wykonane ze szkła na przykład o wymiarach 22 × 15 × 5,5 cm (D × S × W), przykryte zdejmowaną pokrywą z siatki z drutu ze stali nierdzewnej (oczka o średnicy 2 mm). Siatka powinna przykrywać naczynie na narzędzia na poziomie poniżej brzegu.



Do siatki należy przymocować podłoże tarłowe. Powinno ono stworzyć strukturę, w którą mogą wpłynąć ryby. Odpowiednie są na przykład sztuczne rośliny akwariowe wykonane z zielonego tworzywa sztucznego (uwaga: należy uwzględnić możliwą adsorpcję badanej substancji chemicznej do tworzywa sztucznego). Należy wypłukać tworzywo sztuczne w wystarczającej ilości ciepłej wody przez wystarczająco długi czas, aby upewnić się, że żadne substancje chemiczne nie zostaną uwolnione do wody użytej do badania. W przypadku zastosowania materiałów szklanych należy dopilnować, aby ryby nie odniosły obrażeń ani nie były stłoczone w trakcie aktywności tarłowej.

Odległość między tacką i szklanymi szybkami powinna wynosić co najmniej 3 cm, aby upewnić się, że tarło nie odbywa się poza tacą. Jaja złożone na tackę spadają przez siatkę i po upływie 45–60 minut od rozpoczęcia naświetlania można pobrać próbki. Przezroczyste jaja nie są lepkie i można je łatwo policzyć, używając światła poprzecznego. Jeżeli zastosowano pięć samic na naczynie, liczebność jaj na poziomie do 20 dziennie można uznać za niską, do 100 za średnią i powyżej 100 za wysoką. Tackę na ikrę należy wyjąć, zebrać jaja, a następnie ponownie umieścić tackę w naczyniu badawczym jak najpóźniej wieczorem albo bardzo wcześnie rano. Czas do ponownego umieszczenia tacki nie powinien przekraczać jednej godziny, w przeciwnym razie bodźce z podłoża tarłowego mogą wywołać indywidualne tarło i złożenie ikry w nietypowym czasie. Jeżeli okoliczności wymagają późniejszego wprowadzenia tacki na ikrę, należy to zrobić co najmniej 9 godzin po rozpoczęciu naświetlania. O tak później porze dnia nie można już wywołać tarła.

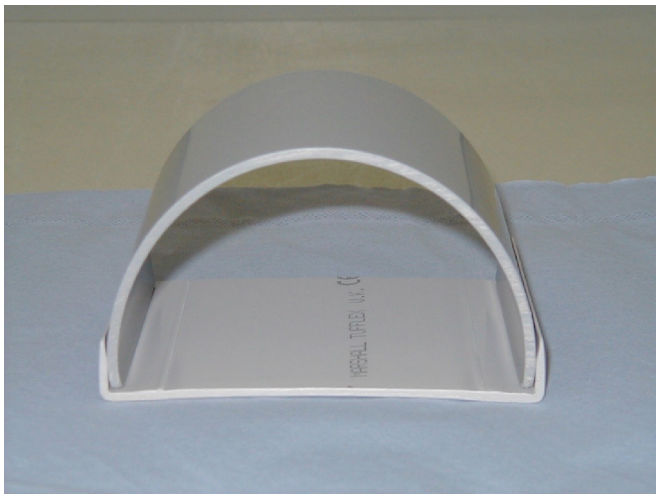
▼M7

Dodatek 4B

PODŁOŻE TARŁOWE DLA STRZEBLI WIELKOGŁOWEJ

Dwie lub trzy połączone płytki i tacki na ikrę wykonane z tworzywa sztucznego, ceramiczne, szklane lub ze stali nierdzewnej umieszcza się w każdej komorze badawczej (np. szara półkolista rynna o długości 80 mm umieszczona na tacce z krawędziami o długości 130 mm) (zob. rysunek). Wykazano, że odpowiednio przygotowane płytki z polichlorku winylu lub ceramiczne nadają się na podłoże tarłowe (Thorpe *et al.*, 2007).

Zaleca się, aby płytki były oszlifowane, w celu zapewnienia lepszej przyczepności. Tacka powinna być również osłonięta, aby ryby nie miały dostępu do złożonej ikry, chyba że wykazano wysoką przyczepność zastosowanego podłoża tarłowego dla ikry.



Podstawę zaprojektowano tak, aby pomieściła wszystkie jaja, które nie przyczepią się do powierzchni płytki i w związku z tym spadłyby na dno zbiornika (lub jaja złożone bezpośrednio na płaską podstawę z tworzywa sztucznego). Przed zastosowaniem wszystkie podłoża tarłowe należy płukać przez co najmniej 12 godzin w wodzie rozcieńczającej.

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

Dodatek 5A

OCENA DRUGORZĘDOWYCH CECH PŁCIOWYCH U STRZEBLI WIELKOGŁOWEJ W CELU WYKRYCIA OKREŚLONYCH SUBSTANCJI CHEMICZNYCH ZABURZAJĄCYCH FUNKCJONOWANIE UKŁADU HORMONALNEGO

Przegląd

Potencjalnie istotne cechy wyglądu fizycznego osobników dorosłych strzebli wielkogłowych w badaniu substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego obejmują zabarwienie ciała (tj. jasne/ciemne), wzór zabarwienia (tj. występowanie lub brak pionowych pręg), kształt ciała (tj. kształt głowy i obszaru piersiowego, wydęcie jamy brzusznej) i wyspecjalizowane drugorzędowe cechy płciowe (tj. liczba i wielkość guzków godowych, wielkość wyściółki tłuszczowej na grzbiecie i pokładełka).

Guzki godowe znajdują się na głowie (wyściółce grzbietowej) aktywnych rozrodczo samców strzebli wielkogłowej i zwykle układają się w dwustronny symetryczny wzór (Jensen *et al*. 2001). Samice z próby kontrolnej oraz młodociane samce i samice nie wykształcają guzków (Jensen *et al*. 2001). Wokół oczu i między nozdrzami samców może występować do ośmiu pojedynczych guzków. Największa liczba guzków i największe guzki są rozmieszczone w dwóch równoległych liniach tuż poniżej nozdrzy i powyżej otworu gębowego. U wielu ryb skupiska guzków występują poniżej dolnej szczęki; te, które znajdują się najbliżej otworu gębowego, zwykle występują jako pojedyncza para, zaś te znajdujące się bliżej brzucha mogą obejmować do czterech guzków. Faktyczna liczba guzków rzadko wynosi więcej niż 30 (zakres: 18–28; Jensen *et al*. 2001). Dominujące guzki (pod względem liczby) pojawiają się jako pojedyncze, względnie okrągłe struktury o wysokości w przybliżeniu równej promieniowi. U większości aktywnych rozrodczo samców przynajmniej niektóre guzki są powiększone i wyraźniejsze, tak że nie da się ich odróżnić jako pojedynczych struktur.

Niektóre rodzaje substancji chemicznych o działaniu zaburzającym funkcjonowanie układu hormonalnego mogą powodować nietypowe pojawianie się drugorzędowych cech płciowych u zwierząt przeciwnej płci; na przykład substancje będące agonistami receptora androgenowego, takie jak 17α-metylotestosteron lub 17β-trenbolon, mogą spowodować powstawanie u samic strzebli wielkogłowej guzków godowych (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), zaś agonisty receptorów estrogenu mogą obniżać liczbę guzków godowych u samców (Miles-Richardson *et al.* 1999; Harries *et al.* 2000).

Poniżej znajduje się opis charakterystyki guzków godowych u strzebli wielkogłowej opracowany na podstawie procedur stosowanych w laboratorium amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska w Duluth w stanie Minnesota. Poszczególne produkty lub sprzęt można zastąpić dostępnymi porównywalnymi materiałami.

Najlepszy ogląd otrzymuje się, stosując podświetlane szkło powiększające lub mikroskop zabiegowy 3X z podświetleniem. Ryby należy oglądać od strony grzbietowej i od przodu (głową w kierunku oglądającego).

— Umieścić rybę na małej szalce Petriego (np. o średnicy 100 mm), głową do przodu i brzuchem do dołu. Ustawić wizjer tak, aby umożliwić identyfikację guzków. Delikatnie i powoli przekręcać rybę z jednej strony na drugą, aby zidentyfikować obszary z guzkami. Policzyć i ocenić guzki.

— Powtórzyć obserwację na powierzchni głowy po stronie brzusznej, umieszczając rybę na szalce Petriego na grzbiecie, głową do przodu.

— Obserwacje każdej ryby powinny trwać do 2 minut.

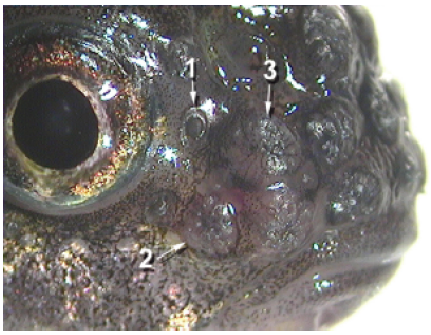
▼M7

Liczenie i ocena guzków

Zidentyfikowano sześć konkretnych obszarów do oceny występowania i rozwoju guzków u osobników dorosłych strzebli wielkogłowej. Opracowano szablon na potrzeby określenia miejsca i liczby występujących guzków (zob. część końcowa niniejszego dodatku). Liczbę guzków zapisuje się, a ich wielkość można ocenić ilościowo dla każdego organizmu w następujący sposób: 0 – brak, 1 – występują, 2 – powiększone i 3 – wyraźne (rys. 1).

Ocena 0 – brak jakichkolwiek guzków. Ocena 1 – występują; identyfikuje się jako dowolne guzki z pojedynczym punktem, którego wysokość jest niemal równa promieniowi. Ocena 2 – powiększone; identyfikuje się za pomocą tkanki przypominającej wyglądem gwiazdkę, zwykle mające duży promień podstawy oraz wyżłobienia lub bruzdy wychodzące ze środka. Wysokość guzka jest zwykle bardziej nieregularna, czasami może on być jednak lekko zaokrąglony. Ocena 3 – wyraźne; guzki są zwykle dość duże i zaokrąglone, o mniej określonej strukturze. Niekiedy guzki będą występowały razem, tworząc jednolitą masę wzdłuż jednego obszaru lub kilku obszarów (B, C i D, opisane poniżej). Zabarwienie i wzór są podobne jak w ocenie 2, czasami jednak trudno je rozróżnić. Zastosowanie tego systemu oceny zwykle prowadzi do otrzymania łącznej oceny guzków wynoszącej <50 u normalnych samców z próby kontrolnej posiadających 18–20 guzków (Jensen et al. 2001).

Rysunek 1



Faktyczna liczba guzków u niektórych ryb może być większa niż liczba rubryk w szablonie dla danego obszaru oceny. Jeżeli tak się stanie, dodatkowe punkty oceny można zaznaczyć w rubryce bądź na prawo lub na lewo od niej. Szablon nie musi być zatem symetryczny. Dodatkową techniką mapowania guzków, które są połączone w pary lub połączone pionowo wzdłuż poziomej płaszczyzny otworu gębowego, może być podwójne zaznaczanie dwóch punktów oceny guzków w jednej rubryce.

Obszary mapowania:

A – Guzki zlokalizowane wokół oka. Mapowane od strony grzbietowej do strony brzusznej wokół przedniej krawędzi oka. Licznie i powszechnie występują u dorosłych samców z próby kontrolnej, nie występują u samic z próby kontrolnej, a u samic narażonych na działanie androgenów zwykle występują w parach (po jednej w pobliżu każdego oka) lub pojedynczo.

B-Guzki zlokalizowane między nozdrzami (porami kanałów sensorycznych). Zwykle występują w parach u samców z próby kontrolnej na wyższych poziomach rozwoju (2 – powiększone lub 3 – wyraźne). Nie występują u samic z próby kontrolnej, u samic narażonych na działanie androgenów występują i rozwijają się w pewnym stopniu.

C – Guzki zlokalizowane bezpośrednio z przodu nozdrzy, równolegle do otworu gębowego. Zwykle są powiększone lub wyraźne u dojrzałych samców z próby kontrolnej. Występują lub powiększone u mniej rozwiniętych samców lub samic poddanych działaniu androgenów.

▼M7

D – Guzki zlokalizowane równolegle wzdłuż linii otworu gębowego. Zwykle oceniane jako rozwinięte u samców z próby kontrolnej. Brak u samic z próby kontrolnej, ale występują u samic narażonych na działanie androgenów.

E – Guzki zlokalizowane na dolnej szczęce, w pobliżu otworu gębowego, zwykle niewielkie i często występujące w parach. Różne u samców z próby kontrolnej lub badanej i samic z próby badanej.

F – Guzki zlokalizowane po stronie brzusznej w kierunku E. Zwykle małe i występujące w parach. Występują u samców z próby kontrolnej i samic poddanych działaniu androgenów.

BIBLIOGRAFIA

(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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 1031–1038.

Szablon dot. guzków:

NR _____

Data_____

Wynik ogółem _____

Skala numeryczna

1-występują

2-powiększone

3-wyraźne

	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

Dodatek 5B

OCENA DRUGORZĘDOWYCH CECH PŁCIOWYCH U RYŻANKI W CELU WYKRYCIA OKREŚLONYCH SUBSTANCJI CHEMICZNYCH ZABURZAJĄCYCH FUNKCJONOWANIE UKŁADU HORMONALNEGO

Poniżej opisano procedurę pomiaru procesów tworzenia się brodawek ([1]), które stanowią drugorzędowe cechy płciowe u ryżanki (*Oryzias latipes*).

1) Po wycięciu wątroby (dodatek 6) zwłoki umieszcza się w probówce stożkowej zawierającej około 10 ml 10-procentowej obojętnej formaliny buforowanej (głową do góry i ogonem do dołu). Jeżeli gonada jest utrwalona w roztworze innym niż 10-procentowa obojętna formalina buforowana, wykonać poprzeczne nacięcie zwłok między przednim obszarem płetwy odbytowej a odbytem za pomocą ostrza, uważając, aby nie uszkodzić gonopora i samej gonady (rys. 3). Umieścić ciało ryby od strony czaszki w roztworze utrwalającym w celu utrwalenia gonady, zaś stronę ogonową – w 10-procentowej obojętnej formalinie buforowanej, jak opisano powyżej.

2) Po umieszczeniu ciała ryby w 10-procentowej obojętnej formalinie buforowanej chwycić przedni obszar płetwy odbytowej pincetą i złożyć ją na około 30 sekund, tak aby płetwa odbytowa pozostała otwarta. Chwytając płetwę odbytową pincetą, ostrożnie złapać kilka promieni płetwy w przednim obszarze, uważając, aby nie zeskrobać procesów tworzenia się brodawek.

3) Po utrzymywaniu otwartej płetwy odbytowej przez około 30 sekund ciało ryby należy umieścić w 10-procentowej obojętnej formalinie buforowanej w temperaturze pokojowej do czasu dokonania pomiaru procesów tworzenia się brodawek (pomiar należy przeprowadzić po utrwalaniu przez co najmniej 24 godziny).

Pomiar

1) Po utrwalaniu ciała ryby w 10-procentowej obojętnej formalinie buforowanej przez co najmniej 24 godziny wyjąć zwłoki ryby z probówki stożkowej i wytrzeć formalinę bibułą filtracyjną (lub ręcznikiem papierowym).

2) Położyć rybę stroną brzuszną do góry. Następnie ostrożnie odciąć płetwę odbytową za pomocą małych nożyczek chirurgicznych (zaleca się odcięcie płetwy odbytowej wraz z niewielką ilością pterygioforu).

3) Chwycić przedni obszar odciętej płetwy odbytowej pincetą i umieścić na szkiełku z kilkoma kroplami wody. Następnie przykryć płetwę odbytową szkiełkiem nakrywkowym. Należy zachować ostrożność, aby nie zeskrobać procesów tworzenia się brodawek podczas chwytania płetwy odbytowej pincetą.

4) Policzyć płytki łączące, na których zachodzą procesy tworzenia się brodawek, za pomocą licznika pod mikroskopem biologicznym (mikroskopem dolnostolikowym lub odwróconym). Uznaje się, że zachodzą procesy tworzenia się brodawek, jeśli ich niewielkie skupisko jest widoczne na tylnym obrzeżu płytki łączącej. Zapisać liczbę płytek łączących, na których zachodzą procesy tworzenia się brodawek dla każdego promienia płetwy

([1]) Procesy tworzenia się brodawek zwykle zachodzą wyłącznie u dorosłych samców na promieniach płetw od drugiego do siódmego lub ósmego, licząc od tylnego końca płetwy odbytowej (rys. 1 i 2).Procesy te rzadko zachodzą jednak na pierwszym promieniu płetwy od tylnego końca płetwy odbytowej. Niniejsza standardowa procedura operacyjna obejmuje pomiar procesów na pierwszym promieniu płetwy (numer promienia płetwy w niniejszej procedurze odpowiada ich kolejności, począwszy od tylnego końca płetwy odbytowej).

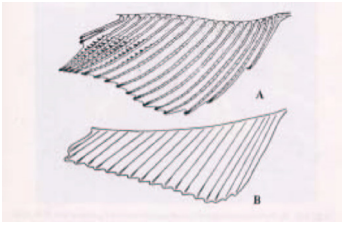
▼M7

w karcie badania (np. pierwszy promień płetwy: 0, drugi promień płetwy: 10, trzeci promień płetwy: 12 itd.) i wpisać sumę tych liczb dla poszczególnych ryb do arkusza kalkulacyjnego Excel. W razie potrzeby zrobić zdjęcie płetwy odbytowej i policzyć liczbę płytek łączących, na których zachodzą procesy tworzenia się brodawek na zdjęciu.

5) Po dokonaniu pomiaru umieścić płetwę odbytową w probówce stożkowej opisanej w (1) i zachować.

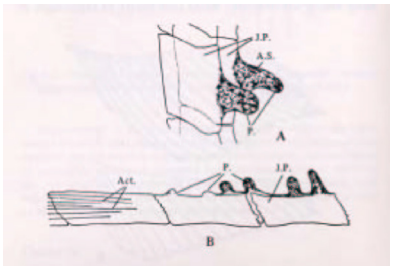
Rys. 1.

Schemat przedstawiający różnice w kształcie i wielkości płetwy odbytowej pomiędzy płciami. A – samiec; B – samica. 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., Uniwersytet w Tokio, IV, 2: s. 209–218.



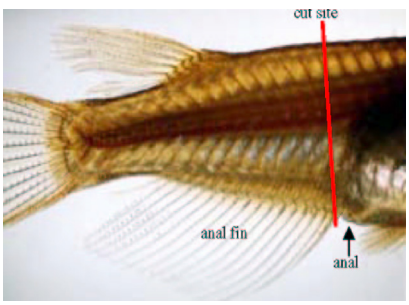
Rys. 2.

A – procesy zachodzące na płytkach łączących promienia płetwy odbytowej. J.P. – płytka łącząca (ang. *joint plate*); A.S. – przestrzeń między osiami (ang. *axial space*); P. – proces; B – tylny koniec promienia płetwy. Actinotrichia (Act.) znajdują się na zakończeniu. 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., Uniwersytet w Tokio, IV, 2: s. 209–218.



Rys. 3.

Zdjęcie ciała ryby przedstawiające miejsce odcięcia, w przypadku gdy gonada jest utrwalona w roztworze utrwalającym innym niż 10-procentowa obojętna formalina buforowana. W takim przypadku pozostała część ciała zostanie odcięta pomiędzy przednim obszarem płetwy odbytowej a odbytem za pomocą ostrza (czerwony pasek); część ciała ryby z głową zostanie umieszczona w roztworze utrwalającym dla gonad, natomiast część ciała ryby z ogonem zostanie umieszczona w 10-procentowej obojętnej formalinie buforowanej.



▼M7

Dodatek 6

ZALECANE PROCEDURY POBIERANIA PRÓBEK DO CELÓW ANALIZY WITELLOGENINY

Należy dołożyć starań, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu między próbkami VTG pobranymi od samców i samic.

Procedura 1A: Strzebla wielkogłowa, pobieranie krwi z żyły/tętnicy ogonowej

Po znieczuleniu trzon ogona nacina się częściowo ostrzem skalpela i pobiera się krew z żyły/tętnicy ogonowej za pomocą kapilary mikrohematokrytowej powlekanej heparyną. Po pobraniu krwi szybko izoluje się osocze przez odwirowanie przy 15 000 *g* przez 3 minuty (lub ewentualnie przy 15 000 *g* przez 10 minut w temperaturze 4 °C). W razie potrzeby po odwirowaniu można oznaczyć hematokryt wyrażony w procentach. Następnie usuwa się osocze z kapilary mikrohematokrytowej i przechowuje w probówce do wirówki z 0,13 jednostki aprotyniny (inhibitor proteaz) w temperaturze – 80 °C, do czasu aż będzie można oznaczyć poziom VTG. W zależności od wielkości strzebli wielkogłowej (która jest zależna od płci) objętość osocza, jaką można pobrać, wynosi zwykle 5–60 mikrolitrów na rybę (Jensen *et al.* 2001).

Procedura 1B: Strzebla wielkogłowa, pobieranie krwi z serca

Krew można również ewentualnie pobrać przez nakłucie serca za pomocą heparynizowanej strzykawki (1 000 jednostek heparyny na ml). Krew przenosi się następnie do probówek Eppendorfa (trzymanych na lodzie) a następnie odwirowuje (5 min, 7 000 *g*, temperatura pokojowa). Osocze należy przenieść do czystych probówek Eppendorfa (w podwielokrotnościach, jeżeli pozwala na to objętość osocza) i niezwłocznie zamrozić w temperaturze – 80 °C do czasu przeprowadzenia analizy (Panter *et al*., 1998).

Procedura 2A: Ryżanka japońska, wycięcie wątroby u ryżanki

Wyjęcie ryb doświadczalnych z komory badawczej

1) Ryby doświadczalne należy wyjąć z komory badawczej za pomocą małego podbieraka. Należy uważać, aby nie wrzucić ryb doświadczalnych do innych komór badawczych.

2) Zasadniczo ryby doświadczalne należy wyjmować w następującej kolejności: próba kontrolna, próba kontrolna z rozpuszczalnikiem (w stosownych przypadkach), próba z najniższym stężeniem, próba ze średnim stężeniem, próba z najwyższym stężeniem, próba z kontrolą dodatnią. Ponadto z jednej komory badawczej należy najpierw wyjąć wszystkie samce, a dopiero potem samice.

3) Płeć każdej z ryb doświadczalnych identyfikuje się na podstawie zewnętrznych drugorzędowych cech płciowych (np. kształtu płetwy odbytowej).

4) Rybę doświadczalną umieścić w pojemniku transportowym i przenieść do stanowiska badawczego w celu wycięcia wątroby. Sprawdzić poprawność etykiet komory badawczej i pojemnika transportowego oraz potwierdzić, że liczba ryb wyjętych z komory badawczej i liczba ryb pozostających w komorze jest zgodna z oczekiwaniami.

5) Jeżeli nie można zidentyfikować płci na podstawie wyglądu zewnętrznego ryby, wyjąć wszystkie ryby z komory badawczej. W takim przypadku płeć należy określić przez obserwację gonad lub drugorzędowych cech płciowych pod mikroskopem stereoskopowym.

Wycięcie wątroby

1) Przenieść ryby doświadczalne z pojemnika transportowego do roztworu środka znieczulającego za pomocą małego podbieraka.

▼M7

2) Po znieczuleniu przenieść ryby doświadczalne na bibułę filtracyjną (lub ręcznik papierowy) za pomocą pincety (typu ogólnodostępnego). Chwytając ryby doświadczalne, przyłożyć pincetę do boków głowy, aby zapobiec złamaniu ogona.

3) Wytrzeć wodę na powierzchni ryb doświadczalnych bibułą filtracyjną (lub ręcznikiem papierowym).

4) Położyć rybę stroną brzuszną do góry. Następnie wykonać małe poprzeczne nacięcie w połowie odległości między brzusznym obszarem szyjnym a środkowym obszarem brzusznym za pomocą nożyczek chirurgicznych.

5) Włożyć nożyczki chirurgiczne do niewielkiego nacięcia i rozciąć jamę brzuszną od punktu ogonowego w kierunku pokrywy skrzelowej do odbytu od strony czaszki wzdłuż środkowej linii jamy brzusznej. Należy uważać, aby nie włożyć nożyczek chirurgicznych zbyt głęboko i nie uszkodzić wątroby i gonady.

6) Przeprowadzić następujące działania pod mikroskopem stereoskopowym.

7) Położyć rybę doświadczalną stroną brzuszną do góry na ręczniku papierowym (można również wykorzystać szklaną szalkę Petriego lub szkiełko mikroskopowe).

8) Rozszerzyć ściany jamy brzusznej pincetą precyzyjną i wyciągnąć organy wewnętrzne na zewnątrz. W razie potrzeby dopuszcza się również wyjęcie organów wewnętrznych przez usunięcie ściany jamy brzusznej z jednej strony.

9) Odsłonić połączoną część wątroby i pęcherzyka żółciowego za pomocą drugiej pincety precyzyjnej. Następnie chwycić przewód żółciowy i odciąć pęcherzyk żółciowy. Należy uważać, aby nie przerwać ściany pęcherzyka żółciowego.

10) Chwycić przełyk i odciąć przewód pokarmowy od wątroby w ten sam sposób. Należy uważać, aby zawartość przewodu pokarmowego nie rozlała się. Odciąć ogonową część przewodu pokarmowego od odbytu i usunąć przewód z jamy brzusznej.

11) Odciąć pas tłuszczu i innych tkanek od brzegów wątroby. Należy uważać, aby nie zadrapać wątroby.

12) Chwycić za przestrzeń wrotną wątroby za pomocą pincety precyzyjnej i wyjąć wątrobę z jamy brzusznej.

13) Położyć wątrobę na szkiełku. W razie potrzeby należy usunąć z powierzchni wątroby dodatkowy tłuszcz i tkankę obcą (np. powłoki jamy brzusznej) za pomocą pincety precyzyjnej.

14) Zmierzyć masę wątroby wraz z mikroprobówką o pojemności 1,5 ml jako tarą za pomocą elektronicznej wagi analitycznej. Odnotować wartość w karcie badania (odczyt: 0,1 mg). Potwierdzić informacje dotyczące identyfikacji na etykiecie umieszczonej na mikroprobówce.

15) Zamknąć mikroprobówkę z wątrobą. Przechowywać ją na statywie chłodzącym (lub w pudełku z lodem).

16) Po wycięciu jednej wątroby wyczyścić narzędzia chirurgiczne albo wymienić je na czyste.

▼M7

17) Wyciąć wątroby wszystkich ryb znajdujących się w pojemniku transportowym zgodnie z powyższym opisem.

18) Po wycięciu wątrób ze wszystkich ryb znajdujących się w pojemniku transportowym (tj. wszystkich samców lub samic w komorze badawczej) umieścić wszystkie próbki wątroby na statywie z probówkami opatrzonymi etykietą do celów identyfikacji i przechowywać w zamrażarce. W przypadku gdy wątroby przekazuje się do obróbki wstępnej niedługo po wycięciu, przenosi się je do kolejnego stanowiska badawczego na statywie chłodzącym (lub w pudełku z lodem).

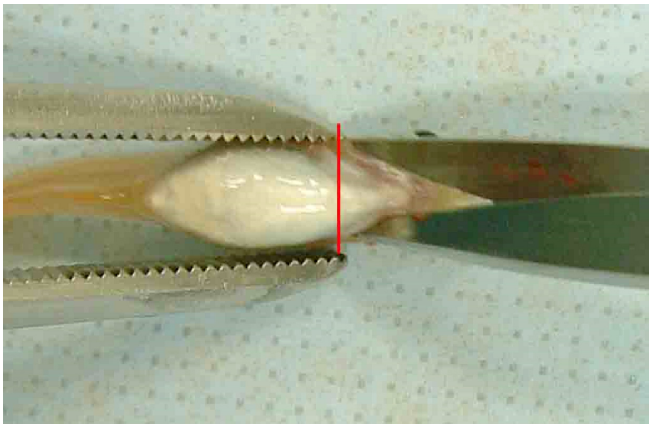
Po wycięciu wątroby zwłoki ryby można wykorzystać na potrzeby badania histologicznego gonad oraz w celu dokonania pomiaru drugorzędowych cech płciowych.

Próbka

Przechowywać próbki wątroby pobrane z ryb doświadczalnych w temperaturze ≤ – 70 °C, jeżeli nie wykorzystuje się ich do obróbki wstępnej niedługo po wycięciu.

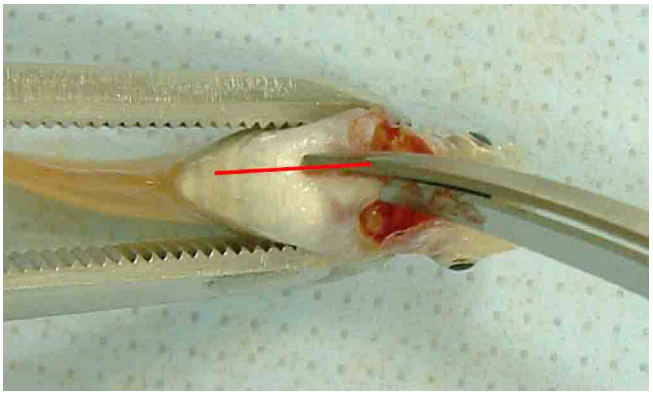
Rys. 1

Nacięcie nożyczkami wykonuje się tuż przed płetwami piersiowymi.



Rys. 2

Środkową linię brzucha nacina się nożyczkami do punktu znajdującego się około 2 mm od odbytu w kierunku czaszki.



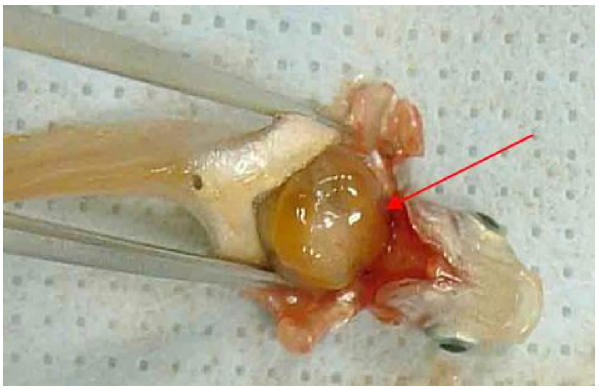
▼M7

Rys. 3

Ściany jamy brzusznej rozszerza się szczypczykami w celu odsłonięcia wątroby i innych organów wewnętrznych.

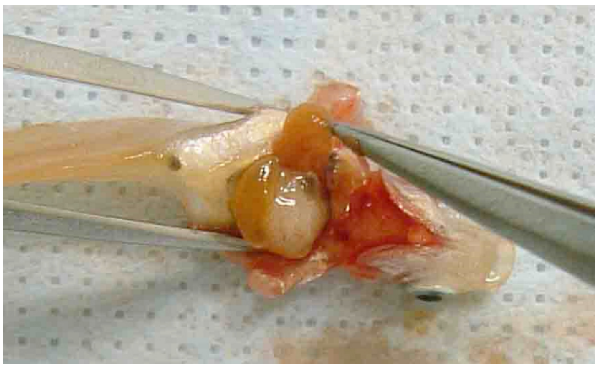
(Ewentualnie można przytrzymać ściany jamy brzusznej po bokach).

Strzałka wskazuje wątrobę.



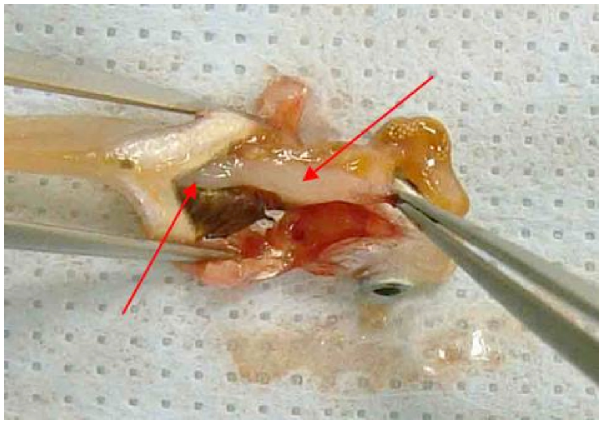
Rys. 4

Wątrobę wyraźnie się izoluje i wycina za pomocą szczypczyków.



Rys. 5

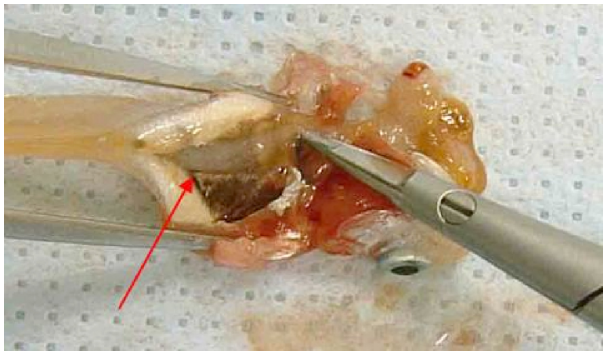
Jelita delikatnie wyciąga się za pomocą szczypczyków.



▼M7

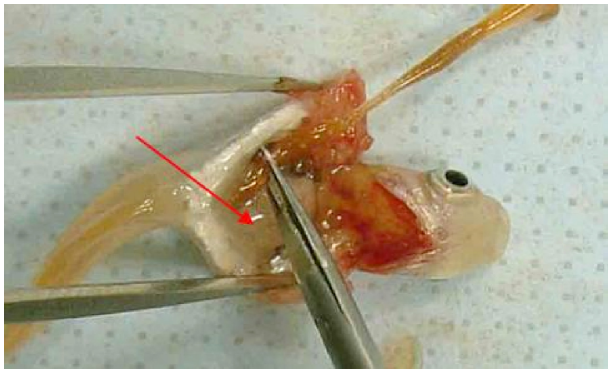
Rys. 6

Oba końce jelit i wszelkie przyczepy krezki odcina się za pomocą nożyczek.



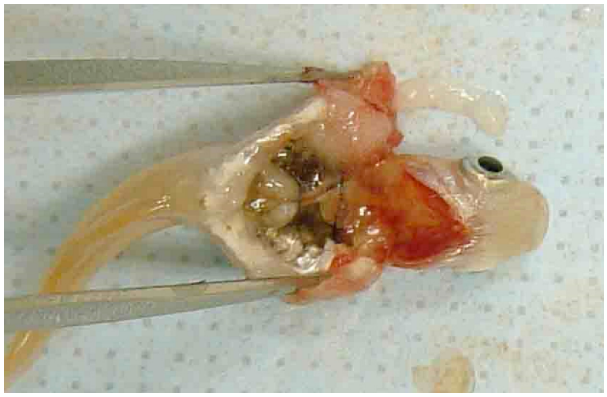
Rys. 7 (samica)

W przypadku samicy stosuje się identyczną procedurę.



Rys. 8

Procedura zakończona.



▼M7

Procedura 2B: Ryżanka japońska (*Oryzias altipes*), obróbka wstępna wątroby przed analizą poziomu witellogeniny.

Wziąć butelkę z roztworem buforowym do homogenizacji z zestawu ELISA i schłodzić ją kruszonym lodem (temperatura roztworu: ≤4 °C). W przypadku zastosowania roztworu buforowego do homogenizacji z układu EnBio ELISA rozmrozić roztwór w temperaturze pokojowej, a następnie schłodzić butelkę kruszonym lodem.

Obliczyć objętość roztworu buforowego do homogenizacji wątroby na podstawie jej masy (dodając 50 µl roztworu buforowego do homogenizacji na 1 mg masy wątroby). Na przykład jeżeli masa wątroby wynosi 4,5 mg, objętość roztworu buforowego do homogenizacji wątroby wynosi 225 µl. Przygotować listę objętości roztworu buforowego do homogenizacji dla wszystkich wątrób.

Przygotowanie wątroby do obróbki wstępnej

1) Bezpośrednio przed rozpoczęciem obróbki wstępnej wyjąć z zamrażarki mikroprobówkę o pojemności 1,5 ml zawierającą wątrobę.

2) Obróbkę wstępną wątroby pobranej od samców należy przeprowadzać przed obróbką wstępną wątroby pobranej od samic, aby zapobiec zanieczyszczeniu witellogeniną. Ponadto obróbkę wstępną badanych grup należy przeprowadzać w następującej kolejności: próba kontrolna, próba kontrolna z rozpuszczalnikiem (w stosownych przypadkach), próba z najniższym stężeniem, próba ze średnim stężeniem, próba z najwyższym stężeniem, próba z kontrolą dodatnią.

3) Liczba mikroprobówek o pojemności 1,5 ml z próbkami wątroby wyjętych jednorazowo z zamrażarki nie powinna przekraczać liczby, którą można odwirować w tym samym czasie.

4) Ułożyć mikroprobówki o pojemności 1,5 ml z próbkami wątroby na statywie chłodzącym w kolejności według numeru próbki (nie ma potrzeby rozmrażania wątroby).

Obróbka wstępna

1) Dodanie roztworu buforowego do homogenizacji

   Sprawdzić na liście, jaką objętość roztworu buforowego do homogenizacji należy zastosować w przypadku danej próbki wątroby, i wyregulować mikropipetę (zakres objętości: 100–1000 µl) do odpowiedniej objętości. Przymocować czystą końcówkę do mikropipety.

   Pobrać roztwór buforowy do homogenizacji z butelki z odczynnikiem i dodać bufor do mikroprobówki o pojemności 1,5 ml zawierającej wątrobę.

   Dodać roztwór buforowy do homogenizacji do wszystkich mikroprobówek o pojemności 1,5 ml zawierających wątrobę zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Nie ma potrzeby zmieniać końcówki mikropipety na nową. Jeżeli jednak końcówka jest zanieczyszczona lub podejrzewa się, że jest zanieczyszczona, należy ją wymienić.

2) Homogenizacja wątroby

   — Przymocować nowy tłuczek do homogenizacji do homogenizatora do mikroprobówek.

   — Włożyć tłuczek do mikroprobówki o pojemności 1,5 ml. Przytrzymać homogenizator do mikroprobówek w taki sposób, aby zgnieść wątrobę między powierzchnią tłuczka a wewnętrzną ścianą mikroprobówki o pojemności 1,5 ml.

   — Uruchomić homogenizator do mikroprobówek na 10–20 sekund. W tym czasie chłodzić mikroprobówkę o pojemności 1,5 ml kruszonym lodem.

▼M7

— Wyjąć tłuczek z mikroprobówki o pojemności 1,5 ml i odstawić ją na około 10 sekund. Następnie przeprowadzić kontrolę wzrokową stanu zawiesiny.

— Jeżeli w zawiesinie widoczne są kawałki wątroby, powtórzyć działania (3) i (4), aby otrzymać zadowalający homogenat wątroby.

— Zawiesinę homogenatu wątroby chłodzić na statywie z lodem do czasu odwirowania.

— Do sporządzenia każdego homogenatu użyć nowego tłuczka.

— Przeprowadzić homogenizację wszystkich wątrób z roztworem buforowym do homogenizacji zgodnie z opisaną wyżej procedurą.

3) Odwirowanie zawiesiny homogenatu wątroby

— Upewnić się, że temperatura schłodzonej komory wirówki wynosi ≤5 °C.

— Włożyć mikroprobówki o pojemności 1,5 ml zawierające zawiesinę homogenatu wątroby do schłodzonej wirówki (w razie potrzeby wyważając).

— Odwirować zawiesinę homogenatu wątroby przy 13 000 *g* przez 10 min w temperaturze ≤ 5 °C. Jeżeli jednak supernatanty są właściwie oddzielone, moc i czas odwirowania można dostosować według potrzeb.

— Po odwirowaniu sprawdzić, czy supernatanty są odpowiednio oddzielone (powierzchnia: lipid, warstwa pośrednia: supernatant, warstwa dolna: tkanka wątroby). Jeżeli oddzielenie nie jest odpowiednie, ponownie odwirować zawiesinę w tych samych warunkach.

— Wyjąć wszystkie próbki ze schładzanej wirówki i ułożyć je na statywie z lodem w kolejności według numeru próbki. Należy uważać, aby po odwirowaniu żadna z oddzielonych warstw nie zawiesiła się ponownie.

4) Zbieranie supernatantu

— Umieścić cztery mikroprobówki do przechowywania supernatantu o pojemności 0,5 ml na statywie na probówki.

— Zebrać 30 µl każdego supernatantu (oddzielonego jako warstwa pośrednia) za pomocą mikropipety i wprowadzić do jednej mikroprobówki o pojemności 0,5 ml. Należy uważać, aby nie zebrać lipidu z powierzchni ani tkanki wątroby z warstwy dolnej.

— Zebrać supernatant i wprowadzić do pozostałych dwóch mikroprobówek o pojemności 0,5 ml w sposób opisany powyżej.

— Zebrać pozostałą część supernatantu za pomocą mikropipety (jeżeli jest to możliwe: ≥100 µl). Następnie wprowadzić supernatant do ostatniej mikroprobówki o pojemności 0,5 ml. Należy uważać, aby nie zebrać lipidu z powierzchni ani tkanki wątroby z warstwy dolnej.

— Zamknąć mikroprobówkę o pojemności 0,5 ml i zapisać na etykiecie objętość supernatantu. Następnie natychmiast schłodzić mikroprobówki na statywie z lodem.

— W przypadku każdego supernatantu wymienić końcówkę mikropipety na nową. Jeżeli do końcówki przyczepi się duża ilość lipidu, należy natychmiast wymienić ją na nową, aby zapobiec zanieczyszczeniu wyciągu z wątroby tłuszczem.

▼M7

— Cały odwirowany supernatant wprowadzić do czterech mikroprobówek o pojemności 0,5 ml zgodnie z wyżej opisaną procedurą.

— Po wprowadzeniu supernatantu do mikroprobówek o pojemności 0,5 ml umieścić je wszystkie na statywie na probówki z etykietą identyfikacyjną, a następnie natychmiast zamrozić w zamrażarce. Jeżeli stężenia VTG mierzy się natychmiast po obróbce wstępnej, należy schłodzić jedną mikroprobówkę o pojemności 0,5 ml (zawierającą 30 µl supernatantu) na statywie na probówki i przenieść do stanowiska badawczego, gdzie przeprowadza się test ELISA. W takim przypadku umieścić pozostałe mikroprobówki na statywach na probówki i zamrozić w zamrażarce.

— Po zebraniu supernatantu odrzucić pozostałości.

Przechowywanie próbki

Przechowywać mikroprobówki o pojemności 0,5 ml zawierające supernatant z homogenatu wątroby w temperaturze ≤ – 70 °C do czasu wykorzystania ich w teście ELISA.

Procedura 3A: Danio pręgowany, pobieranie krwi z żyły/tętnicy ogonowej

Natychmiast po znieczuleniu trzon ogona nacina się poprzecznie i pobiera się krew z żyły/tętnicy ogonowej za pomocą kapilary mikrohematokrytowej powlekanej heparyną. Objętość krwi wynosi 5–15 mikrolitrów, w zależności od wielkości ryby. Do mikrokapilary dodaje się taką samą objętość roztworu buforowego aprotyniny (6 mikrogramów/ml w PBS), a osocze oddziela się od krwi przez odwirowanie (5 minut przy 600 *g*). Osocze zbiera się w probówkach badawczych i przechowuje w temperaturze – 20 °C do czasu przeprowadzenia analizy pod kątem zawartości VTG lub innych białek, które są przedmiotem zainteresowania.

Procedura 3B: Danio pręgowany; pobranie krwi przez nakłucie serca

Aby zapobiec krzepnięciu krwi i degradacji białek, próbki pobiera się w roztworze chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) zawierającym heparynę (1 000 jednostek/ml) i inhibitor proteazy aprotyninę (2 TIU/ml). Zaleca się, aby roztwór buforowy składał się z heparyny, soli amonowej i liofilizowanej aprotyniny. Do pobierania próbek krwi zaleca się używanie strzykawki (1 ml) z cienką igłą (np. Braun Omnikan-F). Strzykawkę należy wstępnie napełnić roztworem buforowym (w przybliżeniu 100 mikrolitrów), aby w pełni eluować niewielkie objętości krwi z każdej ryby. Próbki krwi pobiera się przez punkcję serca. Na początku rybę należy znieczulić za pomocą MS-222 (100 mg/l). Dzięki podaniu znieczulenia w odpowiedni sposób można rozpoznać bicie serca danio pręgowanego. Podczas nakłuwania serca delikatnie naciskać tłok strzykawki. Zakres objętości krwi do pobrania wynosi 20–40 mikrolitrów. Po nakłuciu serca wypełnić probówkę mieszaniną krwi i roztworu buforowego. Osocze oddziela się od krwi przez odwirowanie (20 min; 5 000 *g*) i należy je przechowywać w temperaturze – 80 °C do czasu, aż będzie potrzebne do analizy.

Procedura 3C: Standardowa procedura operacyjna: Danio pręgowany, homogenizacja głowy i ogona

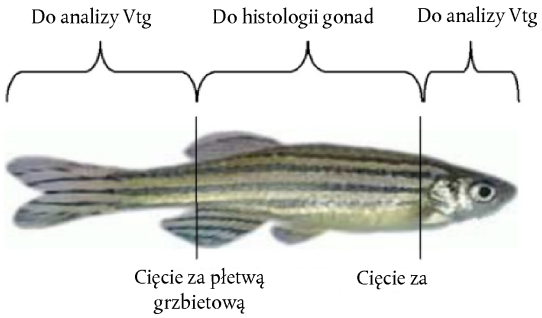
1. Ryby znieczula się i usypia zgodnie z opisem badania.

2. Głowę i ogon odcina się od ryby zgodnie z rys. 1.

Uwaga: *Przyrządy do przeprowadzania sekcji i deskę do krojenia należy wypłukać i odpowiednio wyczyścić (*np. *za pomocą 96 % etanolu) przed obróbką każdej pojedynczej ryby w celu uniknięcia przeniesienia „zanieczyszczenia witellogeniną" z samic lub samców, u których VTG występuje, na samce, u których ona nie występuje.*

▼**M7**

Rysunek 1



3. Łączną masę głowy i ogona każdej z ryb mierzy się z dokładnością do pełnego miligrama.

4. Po zważeniu tych części umieszcza się je w odpowiednich probówkach (np. probówkach Eppendorfa o pojemności 1,5 ml) i zamraża w temperaturze – 80 °C do czasu homogenizacji albo bezpośrednio poddaje homogenizacji z lodem za pomocą dwóch tłuczków z tworzywa sztucznego. (Zastosować można również inne metody, pod warunkiem że stosując je, używa się lodu, i można uzyskać jednorodną masę). Uwaga: *Probówki należy odpowiednio ponumerować, aby głowa i ogon danej ryby mogły zostać przypisane do odpowiadających im części ciała wykorzystywanych do histologii gonad.*

5. Po uzyskaniu jednorodnej masy dodaje się 4-krotność wagi tkanki lodowatego **roztworu buforowego do homogenizacji** ([1]). Mieszaninę należy dalej rozdrabniać za pomocą tłuczków, dopóki nie stanie się jednorodna. Ważna uwaga: *W przypadku każdej ryby wykorzystuje się nowe tłuczki.*

6. Próbki umieszcza się z lodem aż do odwirowania w temp. **4 °C** przy 50 000 *g* przez 30 min.

7. Użyć pipety do wprowadzenia porcji supernatantu o objętości 20 µl do **co najmniej dwóch** probówek przez zanurzenie końcówki pipety pod znajdującą się na wierzchu warstwę tłuszczu i ostrożne zassanie supernatantu bez fragmentów tłuszczu lub grudek.

8. Do momentu wykorzystania probówki przechowuje się w temperaturze – 80 °C.

([1]) Roztwór buforowy do homogenizacji:
— (50 mM Tris-HCL pH 7,4; 1-proc. koktajl inhibitorów proteaz (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl koktajlu inhibitorów proteazy.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), np. firmy Bie & Berntsen, Dania.
— Koktajl inhibitorów proteaz: firmy Sigma (w przypadku tkanek ssaków), numer produktu P 8340.
UWAGA: Roztwór buforowy do homogenizacji należy wykorzystać w tym samym dniu, w którym został wyprodukowany. Podczas stosowania należy umieścić go w lodzie.

▼M7

Dodatek 7

PRÓBKI WZMOCNIONE WITELLOGENINY I MIĘDZYLABORATORYJNY WZORZEC REFERENCYJNY

Każdego dnia, w którym przeprowadza się badania VTG, zostanie przeanalizowana próbka wzmocniona przygotowana z zastosowaniem międzylaboratoryjnego wzorca referencyjnego. VTG wykorzystana do przygotowania międzylaboratoryjnego wzorca referencyjnego będzie pochodzić z innej partii niż partia wykorzystana do przygotowania wzorców kalibracyjnych w odniesieniu do przeprowadzanego badania.

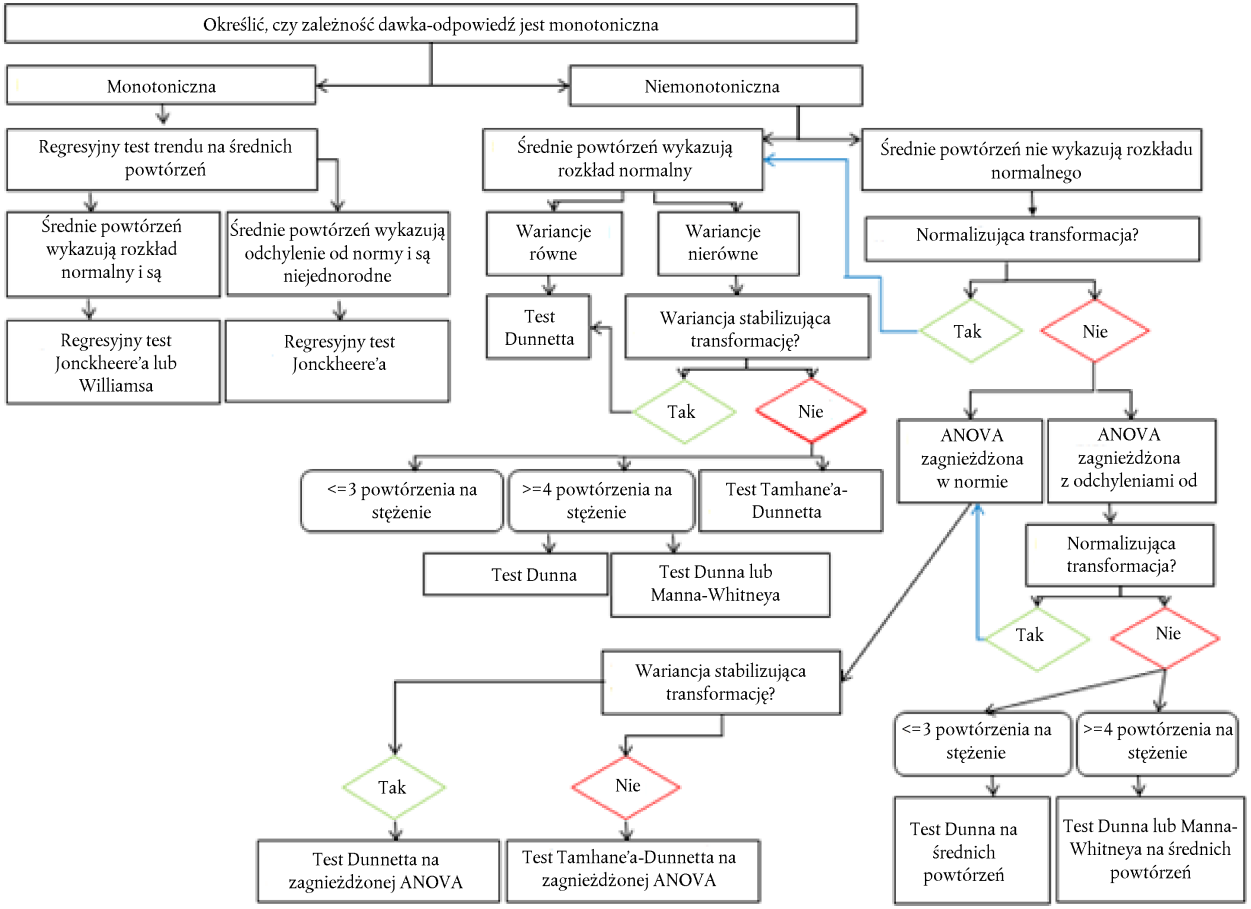
Próbka wzmocniona zostanie przygotowana przez dodanie znanej ilości międzylaboratoryjnego wzorca do próbki osocza pobranego od samca z próby kontrolnej. Próbka zostanie wzmocniona w celu otrzymania stężenia VTG będącego 10–100-krotnością oczekiwanego stężenia witellogeniny u samców ryb z próby kontrolnej. Próbka osocza pobranego od samca z próby kontrolnej, która zostanie wzmocniona, może pochodzić od pojedynczej ryby albo może składać się z próbek pobranych od kilku ryb.

Podpróbka niewzmocnionego osocza samców z próby kontrolnej zostanie poddana analizie w co najmniej dwóch zduplikowanych dołkach. Próbka wzmocniona również zostanie poddana analizie w co najmniej dwóch zduplikowanych dołkach. Średnia ilość witellogeniny w obu niewzmocnionych próbkach osocza pobranych od samców z próby kontrolnej zostanie dodana do obliczonej ilości VTG dodanej do próbek w celu ich wzmocnienia, aby oznaczyć przewidywane stężenie. Stosunek oczekiwanego stężenia do zmierzonego stężenia zostanie odnotowany wraz z wynikami każdego zbioru badań przeprowadzonych w danym dniu.

▼M7

Dodatek 8

SCHEMAT DECYZYJNY DO CELÓW ANALIZY STATYSTYCZNEJ



▼M7

C.49 BADANIE TOKSYCZNOŚCI OSTREJ NA RYBICH EMBRIONACH (FET)

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 236 (2013). Opisuje badanie toksyczności ostrej na rybich embrionach (FET) przeprowadzane na danio pręgowanym (*Danio rerio*). Celem tego badania jest określenie ostrego wpływu toksycznego substancji chemicznych na stadia embrionalne ryby. Badanie toksyczności ostrej na rybich embrionach opiera się na badaniach i czynnościach walidacyjnych prowadzonych na danio pręgowanym (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). Przedmiotowe badanie z powodzeniem stosowano w odniesieniu do szeregu substancji chemicznych, które wykazują różne tryby działania, rozpuszczalności, lotności i hydrofobowości (przeanalizowano w pozycjach 15 i 16).

2. Definicje stosowane w niniejszej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

3. Nowo zapłodnione komórki jajowe danio pręgowanego poddaje się narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej przez 96 godzin. Co 24 godziny rejestruje się do czterech obserwacji szczytowych jako wskaźniki śmiertelności (6): (i) koagulację zapłodnionych jaj, (ii) niewytworzenie się somitów, (iii) nieodrywanie się pączka ogonowego od woreczka żółtkowego oraz (iv) brak bicia serca. Pod koniec okresu narażenia określa się ostrą toksyczność na podstawie wyniku dodatniego w którejkolwiek z czterech zarejestrowanych obserwacji szczytowych oraz oblicza się LC_{50}.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

4. Użyteczne informacje na temat właściwości specyficznych dla substancji obejmują wzór strukturalny, masę cząsteczkową, czystość substancji, stabilność w wodzie i przy narażeniu na działanie światła, pK_a i K_{ow}, rozpuszczalność w wodzie i prężność par, a także wyniki badania szybkiej biodegradowalności (np. metoda badawcza C.4 (17) lub metoda badawcza C.29 (18)). Rozpuszczalność w wodzie i prężność par mogą posłużyć do obliczenia stałej Henry'ego, która wskaże, czy istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia strat wskutek parowania badanej substancji chemicznej. Powinna być dostępna wiarygodna metoda analityczna do oznaczania ilościowego substancji w roztworach do badań o znanej i udokumentowanej dokładności i granicy wykrywalności.

5. Jeżeli daną metodę badawczą stosuje się do badania mieszaniny, należy w miarę możliwości jak najdokładniej scharakteryzować skład tej mieszaniny, np. podając nazwę chemiczną jej składników, ich ilości oraz właściwości specyficzne dla poszczególnych substancji (zob. pkt 4). Przed zastosowaniem metody badawczej w badaniu regulacyjnym mieszaniny należy zastanowić się nad tym, czy wyniki uzyskane w wyniku jej stosowania będą możliwe do zaakceptowania w odniesieniu do założonego celu regulacyjnego.

6. Jeżeli chodzi o substancje, które mogą być aktywowane przez metabolizm, istnieją dowody, że embriony danio pręgowanego posiadają zdolności metaboliczne (19)(20)(21)(22). Zdolność metaboliczna rybich embrionów nie zawsze jest jednak podobna do zdolności młodych lub dorosłych osobników. Na przykład w badaniu toksyczności ostrej na rybich embrionach pominięto alkohol allilowy będący protoksykantem (9). Dlatego też, jeżeli istnieją jakiekolwiek przesłanki, że metabolity lub inne mające znaczenie produkty przemiany mogą być bardziej toksyczne niż związek macierzysty, zaleca się także przeprowadzenie badania z wykorzystaniem tych metabolitów/produktów przemiany oraz wykorzystanie uzyskanych wyników przy określaniu toksyczności badanej substancji chemicznej lub alternatywnie przeprowadzenie innego badania, w którym uwzględnia się metabolizm.

7. W przypadku substancji o masie cząsteczkowej $\geq$ 3kDa i strukturze cząsteczkowej o dużej objętości oraz substancji powodujących opóźnione wylęganie, które mogą uniemożliwić lub zmniejszyć narażenie po wylęgu, oczekuje się, że embriony nie będą wrażliwe ze względu na ograniczoną biodostępność substancji i odpowiedniejsze mogą być inne badania toksyczności.

▼M7

WAŻNOŚĆ BADANIA

8. Aby wyniki badań były ważne, muszą zostać spełnione następujące kryteria:

a) ogólny wskaźnik zapłodnienia wszystkich zebranych jaj powinien wynosić ≥ 70 % w badanej partii;

b) przez cały czas trwania badania należy utrzymać temperaturę wody na poziomie 26 ± 1 °C w komorach badawczych;

c) ogólna liczba embrionów, które przeżyły, w kontroli ujemnej (woda rozcieńczająca) i, w uzasadnionych przypadkach, w kontroli z rozpuszczalnikiem, powinna wynosić ≥ 90 % aż do zakończenia 96-godzinnego okresu narażenia;

d) narażenie na substancję służącą do kontroli dodatniej (np. 4,0 mg/l 3,4-dichloroaniliny w przypadku danio pręgowanego) powinno doprowadzić do minimalnej upadkowości na poziomie 30 % pod koniec 96-godzinnego okresu narażenia;

e) wskaźnik wylęgu w kontroli ujemnej (oraz kontroli z rozpuszczalnikiem w stosownych przypadkach) powinien wynosić ≥ 80 % pod koniec 96-godzinnego okresu narażenia;

f) pod koniec 96-godzinnego okresu narażenia stężenie rozpuszczonego tlenu w kontroli ujemnej i najwyższe badane stężenie powinny być na poziomie ≥ 80 % nasycenia.

OPIS METODY

9. Przegląd zalecanych warunków utrzymywania i badania przedstawiono w dodatku 2.

Aparatura

10. Niezbędny jest następujący sprzęt:

a) akwaria wykonane z chemicznie obojętnego materiału (np. szkła) o odpowiedniej objętości w zależności od zalecanego obciążenia (zob. pkt 14 „Utrzymywanie tarlaków”);

b) mikroskop odwrócony lub dwuokularowy o co najmniej 80-krotnym powiększeniu. Jeżeli powietrza w pomieszczeniu wykorzystywanym do rejestrowania obserwacji nie można doprowadzić do temperatury 26 ± 1 °C, konieczne jest zastosowanie etapu z przemieszczaniem poprzecznym z kontrolowaną temperaturą lub innych metod w celu utrzymania temperatury;

c) komory badawcze; np. standardowe płytki z 24 dołkami o głębokości około 20 mm (zob. pkt 11 „Komory badawcze”);

d) np. folia samoprzylepna do zakrycia płytek 24-dołkowych;

e) inkubator lub klimatyzowane pomieszczenie z kontrolowaną temperaturą, pozwalające utrzymać temperaturę 26 ± 1 °C w dołkach (lub komorach badawczych);

f) pehametr;

g) miernik tlenu;

h) sprzęt do oznaczania twardości wody i przewodności;

i) podkładka na ikrę: tacki na narzędzia wykonane ze szkła, stali nierdzewnej lub innych obojętnych materiałów; siatka druciana (rozmiar oczek 2 ± 0,5 mm) wykonana ze stali nierdzewnej lub innego obojętnego materiału w celu ochrony złożonych jaj; podłoże tarłowe (np. sztuczne rośliny z obojętnego materiału) (metoda badawcza C.48 dodatek 4a (23));

j) pipety z rozszerzonymi otworami do zbierania jaj;

▼M7

k) naczynia szklane do przygotowywania różnych badanych stężeń i wody rozcieńczającej (zlewki, kolby miarowe, cylindry miarowe i pipety miarowe) lub zbierania jaj danio pręgowanego (np. zlewki, krystalizatory);

l) jeżeli do przeprowadzenia badania wykorzystuje się alternatywne systemy narażenia, takie jak system przepływowy (24) lub pasywne dawkowanie (25), niezbędne są właściwe urządzenia i sprzęt.

Komory badawcze

11. Należy stosować komory badawcze wykonane ze szkła lub polistyrenu (np. płytki 24-dołkowe o pojemności 2,5–5 ml na każdy dołek). W przypadku gdy podejrzewa się adsorpcję polistyrenu (np. w przypadku niepolarnych, planarnych substancji o wysokim K_{OW}), należy stosować obojętne materiały (szkło) w celu zmniejszenia strat spowodowanych adsorpcją (26). Zaleca się losowe rozmieszczenie komór badawczych w inkubatorze.

Warunki dotyczące wody i badania

12. Zaleca się rozcieńczenie wody służącej do utrzymywania ryb w celu osiągnięcia poziomów twardości typowych dla różnych wód powierzchniowych. Wodę rozcieńczającą należy przygotować z wody regenerowanej (27). Uzyskany stopień twardości powinien być równy 100–300 mg/l $CaCO_3$, aby uniknąć nadmiernego strącania węglanu wapnia. Można wykorzystać inne dobrze opisane rodzaje wód powierzchniowych lub ze studni. Wodę regenerowaną można dostosować, aby uzyskać wodę do utrzymywania ryb o niskim poziomie twardości, przez rozcieńczenie wodą dejonizowaną w stosunku 1:5 do minimalnej twardości wynoszącej 30–35 mg/l $CaCO_3$. Przed dodaniem badanej substancji chemicznej wodę napowietrza się w celu nasycenia jej tlenem. Temperaturę w dołkach należy utrzymywać na poziomie 26 ± 1 °C przez cały okres badania. Współczynnik pH powinien mieścić się w przedziale 6,5–8,5 pH i nie powinien odbiegać od tego zakresu o więcej niż 1,5 jednostki w trakcie badania. Jeżeli nie oczekuje się, że pH utrzyma się w tym przedziale, wówczas przed rozpoczęciem badania należy dokonać regulacji pH. Regulację pH należy przeprowadzić w taki sposób, aby stężenie roztworu podstawowego nie zostało istotnie zmienione i aby nie doszło do żadnej reakcji chemicznej lub strącenia badanej substancji chemicznej. Zaleca się stosowanie chlorowodoru (HCl) i wodorotlenku sodu (NaOH) do regulowania pH w roztworach zawierających badaną substancję chemiczną.

Roztwory do badań

13. Roztwory do badań o wybranych stężeniach można przygotować np. przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Roztwory podstawowe najlepiej jest przygotowywać przez mechaniczne mieszanie lub wstrząsanie badanej substancji chemicznej z wodą rozcieńczającą (np. poprzez mieszanie lub sonikację). Jeżeli badana substancja chemiczna jest trudno rozpuszczalna w wodzie, należy zastosować procedury postępowania z trudnymi substancjami i mieszaninami opisane w wytycznej OECD nr 23 (28). Należy unikać stosowania rozpuszczalników, choć w niektórych przypadkach może okazać się to konieczne, aby przygotować roztwór podstawowy o odpowiednim stężeniu. Jeżeli używa się rozpuszczalnika w celu ułatwienia przygotowania roztworu podstawowego, jego stężenie końcowe nie powinno przekraczać 100 ml/l i powinno być takie samo we wszystkich naczyniach badawczych. W przypadku stosowania rozpuszczalnika wymagana jest dodatkowa kontrola z rozpuszczalnikiem.

Utrzymywanie tarlaków

14. Do wytwarzania jaj wykorzystuje się stado hodowlane nienarażonych osobników danio pręgowanego ze szczepu typu dzikiego, w przypadku których wskaźnik zapłodnienia jaj jest dobrze udokumentowany. Ryby powinny być wolne od makroskopowo dostrzegalnych objawów zakażenia i choroby oraz nie powinny przechodzić leczenia farmaceutycznego (objawowego lub profilaktycznego) przez dwa miesiące przed tarłem. Ryby hodowlane utrzymuje

▼M7

się w akwariach o zalecanej pojemności obciążeniowej wynoszącej 1 l wody na jedną rybę i o stałym fotoperiodzie trwającym 12–16 godzin (29)(30)(31)(32)(33). Należy dostosować optymalne wskaźniki filtracji; należy unikać wysokich wskaźników filtracji powodujących znaczne zakłócenie wody. Warunki karmienia można znaleźć w dodatku 2. Należy unikać nadmiernego karmienia i regularnie monitorować jakość i czystość wody w akwariach oraz, w razie potrzeby, przywracać stan wyjściowy.

Badanie biegłości

15. Substancję chemiczną odniesienia, 3,4-dichloroanilinę (wykorzystywaną w badaniach walidacyjnych (1)(2)), należy zbadać w pełnym zakresie zależności stężenie-odpowiedź w celu sprawdzenia wrażliwości użytego szczepu ryb, najlepiej dwa razy w roku. W każdym laboratorium zaczynającym przeprowadzanie tego badania należy zastosować substancję chemiczną odniesienia. Laboratorium może stosować tę substancję chemiczną w celu wykazania swojej biegłości technicznej w zakresie przeprowadzania badania przed przedstawieniem danych do celów regulacyjnych.

Wytwarzanie jaj

16. Jaja danio pręgowanego mogą być wytwarzane przez grupy tarłowe (w pojedynczych zbiornikach tarłowych) lub przez masowe tarło (w zbiornikach do utrzymywania tarlaków). W przypadku grup tarłowych samce i samice (np. w stosunku 2:1) w grupie hodowlanej umieszcza się w zbiornikach tarłowych na kilka godzin przed wyłączeniem światła w dniu poprzedzającym badanie. Z uwagi na fakt, że okazjonalnie nie dochodzi do tarła w grupach tarłowych danio pręgowanego, zaleca się równoczesne korzystanie z co najmniej trzech zbiorników tarłowych. Aby uniknąć błędu genetycznego, jaja pobiera się od co najmniej trzech grup hodowlanych, zmieszanych i losowo wybranych.

17. W celu zebrania ikry podkładki na ikrę umieszcza się w zbiornikach tarłowych lub zbiornikach do utrzymywania tarlaków przed zapadnięciem zmroku w dniu poprzedzającym badanie lub przed nadejściem świtu w dniu badania. Aby uniknąć drapieżnych ataków dorosłych osobników danio pręgowanego na jaja, podkładki na ikrę przykrywa się obojętną siatką drucianą o odpowiednim rozmiarze oczek (około 2 ± 0,5 mm). W razie konieczności do siatki można przymocować sztuczne rośliny wykonane z obojętnego materiału (np. tworzywa sztucznego lub szkła) jako bodziec zachęcający do tarła (3)(4)(5)(23)(35). Należy stosować zwietrzałe materiały z tworzywa sztucznego, które się nie wypłukują (np. ftalany).Krycie, tarło i zapładnianie odbywa się w ciągu 30 min po włączeniu światła i następnie ostrożnie wyjmuje się podkładki z zebraną ikrą. Zaleca się opłukanie jaj wodą regenerowaną po zebraniu ich z podkładek na ikrę.

Zróżnicowanie jaj

18. Przy temperaturze 26 °C w zapłodnionych jajach po około 15 minutach zachodzi pierwsze bruzdkowanie, a w wyniku kolejnych synchronicznych bruzdkowań powstają blastomery 4-, 8-, 16- i 32-komórkowe (zob. dodatek 3) (35). Na tych etapach można wyraźnie zidentyfikować zapłodnione jaja, w których wytworzyła się blastula.

PROCEDURA

Warunki narażenia na działanie substancji

19. Dwadzieścia embrionów na stężenie (jeden embrion na dołek) podaje się działaniu badanej substancji chemicznej. Narażenie powinno być takie, aby przez cały czas trwania badania utrzymywane było nominalne stężenie substancji chemicznej ± 20 %. Jeżeli nie jest to możliwe w układzie statycznym, należy zastosować łatwiejszy w obsłudze układ półstatyczny z przerwą na wymianę (np. wymiana co 24 godziny). W takich przypadkach należy skontrolować stężenia ekspozycyjne przynajmniej przy najwyższym i najniższym badanym stężeniu na początku i na koniec każdego okresu narażenia (zob. pkt 36). Jeżeli nie można utrzymać stężenia ekspozycyjnego na poziomie ± 20 % stężenia nominalnego, wszystkie stężenia należy zmierzyć na początku i na koniec każdego okresu narażenia (zob. pkt 36). Przy wymianie należy zadbać o to, aby embriony pozostały pokryte niewielką ilością starych roztworów do badań w celu uniknięcia wysuszenia. Plan

▼M7

badania można dostosować w celu spełnienia wymogów badania dotyczących określonych substancji (np. system przepływowy (24) lub system pasywnego dawkowania (25) w przypadku substancji łatwo ulegających rozkładowi lub wysoce adsorpcyjnych (29) lub inne w przypadku substancji lotnych (36)(37)). W każdym razie należy dołożyć starań, aby zminimalizować ewentualny stres dla embrionów. Komory badawcze należy kondycjonować z roztworami do badań przez co najmniej 24 godziny przed rozpoczęciem badania. Podsumowanie warunków badania można znaleźć w dodatku 2.

Badane stężenia

20. Zwykle w celu spełnienia wymogów statystycznych wymaganych jest pięć stężeń badanej substancji chemicznej, które różnią się o taką samą wielokrotność nieprzekraczającą 2,2. Jeżeli użyto mniej niż pięć stężeń, należy podać uzasadnienie. Najwyższe badane stężenie powinno w miarę możliwości skutkować śmiertelnością na poziomie 100 %, a najniższe badane stężenie nie powinno w miarę możliwości powodować żadnych szkodliwych zmian, jak określono w pkt 28. Badanie ustalające zakres przeprowadzone przed ostatecznym badaniem pozwala na wybór odpowiedniego zakresu stężenia. Zakres ustala się zazwyczaj przy pomocy dziesięciu embrionów na stężenie. Poniższe instrukcje odnoszą się do badania wykonywanego na płytkach 24-dołkowych. Jeżeli stosuje się inne komory badawcze (np. małe szalki Petriego) lub bada się większą liczbę stężeń, należy odpowiednio dostosować instrukcje.

21. Dane szczegółowe oraz instrukcje wizualne dotyczące przydzielania stężeń do płytek 24-dołkowych są dostępne w pkt 27 i dodatku 4 rys. 1.

Kontrole

22. Próby kontrolne z wodą rozcieńczającą są wymagane zarówno jako kontrola ujemna, jak i jako wewnętrzna kontrola płytek. Jeżeli w ramach wewnętrznej kontroli płytek zaobserwuje się więcej niż jeden martwy embrion, odrzuca się daną płytkę, zmniejszając tym samym liczbę stężeń wykorzystanych do wyprowadzenia LC_{50}. Jeżeli cała płytka zostanie odrzucona, ocena i rozróżnienie obserwowanych zmian mogą stać się trudniejsze, zwłaszcza gdy odrzucona płytka jest płytką służącą do kontroli z rozpuszczalnikiem lub płytką, na której wpływ był również wywierany na embriony poddane działaniu badanej substancji. W pierwszym przypadku konieczne jest powtórzenie badania. W drugim przypadku utrata całej grupy badanej wskutek śmiertelności badanej w ramach kontroli wewnętrznej może ograniczyć zdolność do oceny zmian i określenia wartości LC_{50}.

23. Kontrolę dodatnią przy stałym stężeniu wynoszącym 4 mg/l 3,4 dichloroaniliny przeprowadza się na każdej partii jaj wykorzystywanej do badania.

24. W przypadku stosowania rozpuszczalnika dodatkowa grupa 20 embrionów jest narażona na działanie rozpuszczalnika umieszczonego na oddzielnej płytce 24-dołkowej, dlatego takie działanie określane jest mianem kontroli z rozpuszczalnikiem. Aby badanie można było uznać za możliwe do zaakceptowania, należy wykazać, że rozpuszczalnik nie ma istotnego wpływu na czas potrzebny do wylęgu, przeżywalność, ani nie powoduje wystąpienia żadnych innych niekorzystnych skutków dla embrionów (por. pkt 8c).

Rozpoczęcie narażenia na działanie substancji i czas trwania badania

25. Badanie rozpoczyna się jak najszybciej po zapłodnieniu komórek jajowych i kończy się po upływie 96 godzin narażenia na działanie substancji. Embriony należy zanurzyć w roztworze do badań przed rozpoczęciem bruzdkowania tarczy zarodkowej lub najpóźniej przed osiągnięciem stadium 16-komórkowego. Aby narażenie na działanie substancji rozpoczęło się z minimalnym opóźnieniem, dokonuje się losowego wyboru co najmniej dwukrotności liczby jaj potrzebnych w każdej grupie badanej i przenosi się je do próbek zawierających odpowiednie stężenia i do prób kontrolnych (np. do krystalizatorów o pojemności 100 ml; jaja powinny był w pełni zanurzone) nie później niż 90 minut po zapłodnieniu.

26. Zdolne do przeżycia zapłodnione jaja należy oddzielić od niezapłodnionych jaj i w ciągu 180 minut od zapłodnienia przenieść do płytek 24-dołkowych, prekondycjowanych przez 24 godziny i ponownie napełnionych świeżo przygotowanymi roztworami do badań w ilości 2 ml na dołek. Korzystając

▼M7

z mikroskopu stereoskopowego (najlepiej w powiększeniu ≥ 30-krotnym), wybiera się zapłodnione jaja, w których zachodzi bruzdkowanie i które nie wykazują żadnych oczywistych nieprawidłowości podczas bruzdkowania (np. asymetrii, tworzenia się pęcherzyków) ani uszkodzeń kosmówki. Więcej informacji na temat wyboru i oddzielania jaj można znaleźć w dodatku 3 rys. 1 i 3 i w dodatku 4 rys. 2.

Rozmieszczanie jaj w płytkach 24-dołkowych

27. Liczba jaj rozmieszczonych w płytkach dołkowych (zob. również dodatek 4 rys. 1) jest następująca:

— 20 jaj na jednej płytce dla każdego badanego stężenia;

— 20 jaj jako kontrola z rozpuszczalnikiem na jednej płytce (w razie potrzeby);

— 20 jaj jako kontrola dodatnia na jednej płytce;

— 4 jaja w wodzie rozcieńczającej jako wewnętrzna kontrola płytek na każdej z powyższych płytek;

— 24 jaja w wodzie rozcieńczającej jako kontrola ujemna na jednej płytce.

Obserwacje

28. Na każdym embrionie poddanym badaniu przeprowadza się obserwacje szczytowe pod kątem występowania: koagulacji embrionów, niewytworzenia się somitów, nieodłączenia się ogona i braku bicia serca (tabela 1). Obserwacje te wykorzystuje się do określenia śmiertelności: uzyskanie jakiegokolwiek wyniku dodatniego w jednej ze wspomnianych obserwacji oznacza, że embrion danio pręgowanego jest martwy. Ponadto codziennie, począwszy od 48. godziny, odnotowuje się przypadki wylęgania w grupach badanych i grupach kontrolnych. Obserwacje odnotowuje się co 24 godziny, aż do zakończenia badania.

Tabela 1

Obserwacje szczytowe występowania ostrej toksyczności u embrionów danio pręgowanego w ciągu 24–96 godzin od zapłodnienia

	Czas narażenia na działanie substancji			
	24 godziny	48 godzin	72 godziny	96 godzin
Embriony skoagulowane	+	+	+	+
Niewytworzenie się somitów	+	+	+	+
Nieodłączanie się ogona	+	+	+	+
Brak bicia serca		+	+	+

29. *Koagulacja embrionu:* skoagulowane embriony są koloru mlecznobiałego i wydają się być ciemne podczas badania pod mikroskopem (zob. dodatek 5 rys. 1). Liczbę skoagulowanych embrionów określa się po upływie 24, 48, 72 i 96 godzin.

30. *Niewytworzenie się somitów:* w temperaturze 26 ± 1 °C po upływie 24 godzin u prawidłowo rozwijających się embrionów danio pręgowanego wytworzyło się około 20 somitów (zob. dodatek 5 rys. 2). Prawidłowo rozwijający się embrion wykazuje spontaniczne ruchy (skurcze z boku na bok). Pojawienie się spontanicznych ruchów wskazuje na tworzenie się somitów. Brak somitów odnotowuje się po upływie 24, 48, 72 i 96 godzin. Niewytworzenie się somitów po upływie 24 godzin może być spowodowane ogólnym opóźnieniem rozwoju. Najpóźniej po upływie 48 godzin powinny się wytworzyć somity. Jeżeli tak nie jest, embriony uznaje się za martwe.

31. *Nieodłączenie się ogona:* u prawidłowo rozwijających się embrionów danio pręgowanego odłączenie się ogona (zob. załącznik 5 rys. 3) od woreczka

▼M7

żółtkowego obserwuje się po wydłużeniu tylnej części ciała embrionu. Nieodłączenie się ogona odnotowuje się po upływie 24, 48, 72 i 96 godzin.

32. *Brak bicia serca:* u prawidłowo rozwijających się embrionów danio pręgowanego przebywających w temperaturze 26 ± 1 °C bicie serca można zaobserwować po upływie 48 godzin (zob. dodatek 5 rys. 4). Należy zachować szczególną ostrożność podczas odnotowywania tego punktu końcowego, ponieważ nieregularnego (zmiennego rytmu) bicia serca *nie* należy odnotowywać jako śmierci embrionu. Ponadto za śmierć embrionu nie uznaje się widocznego bicia serca bez przepływu krwi w tętnicy brzusznej. Aby odnotować przedmiotowy punkt końcowy, embriony niewykazujące bicia serca należy obserwować przez co najmniej minutę przy minimalnym, 80-krotnym powiększeniu. Brak bicia serca odnotowuje się po upływie 48, 72 i 96 godzin.

33. Wskaźniki wylęgu we wszystkich grupach badanych i grupach kontrolnych należy odnotowywać i zgłaszać począwszy od upłynięcia 48 godzin. Chociaż wylęganie nie stanowi punktu końcowego wykorzystywanego do obliczenia LC_{50}, wylęganie zapewnia narażenie embrionu na działanie substancji bez potencjalnej bariery ochronnej zapewnianej przez kosmówkę, i jako takie może pomóc w interpretacji danych.

34. Szczegółowe opisy prawidłowego rozwoju embrionów danio pręgowanego (35) i przykłady nieprawidłowego rozwoju embrionów danio pręgowanego przedstawiono w dodatkach 3 i 5.

Pomiary analityczne

35. Na początku i pod koniec badania dokonuje się pomiaru pH, całkowitej twardości i przewodności w próbie kontrolnej lub próbach kontrolnych oraz w próbie zawierającej najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej. W układach półstatycznych z wymianą pomiary pH należy przeprowadzać przed wymianą i po wymianie wody. Jeżeli jest to zgodne z kryteriami ważności badania (zob. pkt 8f), pod koniec badania dokonuje się pomiaru stężenia rozpuszczonego tlenu w próbach kontrolnych ujemnych oraz w próbie zawierającej najwyższe badane stężenie, w których znajdują się embriony zdolne do przeżycia. Jeżeli występują obawy dotyczące tego, że temperatury w płytkach 24-dołkowych mogą być różne, dokonuje się pomiaru temperatury w trzech losowo wybranych naczyniach. Zaleca się ciągłe, lub co najmniej codzienne, odnotowywanie temperatury w trakcie trwania badania.

36. W układzie statycznym na początku i pod koniec badania należy dokonać pomiaru stężenia badanej substancji chemicznej przynajmniej w próbkach zawierających najwyższe i najniższe badane stężenia, lecz zaleca się dokonywanie pomiarów we wszystkich próbkach poddanych działaniu substancji chemicznej. W badaniach półstatycznych (z wymianą), w których oczekuje się, że stężenie badanej substancji chemicznej pozostanie w zakresie ± 20 % wartości nominalnych, zaleca się co najmniej przeprowadzenie analizy próbek zawierających najwyższe i najniższe badane stężenia w roztworach świeżo przygotowanych i przed samą wymianą. W przypadku badań, w których nie oczekuje się, że stężenie badanej substancji chemicznej pozostanie w zakresie ± 20 % stężenia nominalnego, konieczne jest analizowanie wszystkich badanych stężeń – roztworów świeżo przygotowanych i bezpośrednio przed wymianą. Jeżeli objętość próbki jest zbyt mała, by poddać ją analizie, użyteczne może być połączenie roztworów do badań lub wykorzystanie komór zastępczych wykonanych z tego samego materiału i o takim samym stosunku objętości do powierzchni jak płytki 24-dołkowe. Zaleca się, aby wyniki były oparte na mierzonych stężeniach. Jeżeli zmierzone stężenia nie utrzymują się w granicach 80–120 % stężenia nominalnego, stężenia efektywne należy wyrazić względem średniej geometrycznej zmierzonych stężeń; zob. rozdział 5 wytycznej OECD „Guidance Document No. 23 on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures” (28).

BADANIE GRANICZNE

37. Stosując procedury opisane w niniejszej metodzie badawczej, badanie graniczne można przeprowadzić przy 100 ml/l badanej substancji chemicznej lub przy jej granicznej rozpuszczalności w badanej pożywce użytej do badań (którakolwiek z tych wartości jest niższa) w celu wykazania, że LC_{50} jest większe od tego stężenia. Badanie graniczne należy przeprowadzić na 20 embrionach w próbie poddanej działaniu substancji chemicznej, w próbie

▼M7

kontrolnej dodatniej oraz – w razie potrzeby – w kontroli z rozpuszczalnikiem oraz na 24 embrionach w próbie kontrolnej ujemnej. Jeżeli odsetek organizmów, które nie przeżyły, w badanym stężeniu przekracza upadkowość w próbie kontrolnej ujemnej (lub w kontroli z rozpuszczalnikiem) o 10 %, należy przeprowadzić pełne badanie. Należy odnotować wszelkie zaobserwowane skutki. Jeżeli upadkowość w próbie kontrolnej ujemnej (lub w kontroli z rozpuszczalnikiem) przekracza 10 %, badanie staje się nieważne i należy je powtórzyć.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

38. W niniejszym badaniu poszczególne dołki uznaje się za niezależne kontrpróby na potrzeby analizy statystycznej. Wartości procentowe oznaczające embriony, u których w ciągu 48 lub 96 godzin zaobserwowano co najmniej jeden dodatni wynik obserwacji szczytowej, należy wykreślić na wykresie względem badanych stężeń. W celu obliczenia nachylenia krzywej, wartości LC_{50} i granic ufności (95 %), należy zastosować odpowiednie metody statystyczne (38) i należy zapoznać się z wytycznymi OECD „Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data” (39).

Sprawozdanie z badania

39. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub nazwa CAS, numer CAS, identyfikator SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp. (w tym w stosownych przypadkach zawartość węgla organicznego);

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Organizmy doświadczalne:

— nazwa systematyczna, szczep, źródło i metoda pobierania zapłodnionych jaj i dalsza obróbka.

Warunki badania:

— zastosowana procedura badawcza (np. układ półstatyczny z wymianą);

— fotoperiod;

— plan badania (np. liczba komór badawczych, rodzaje prób kontrolnych);

— charakterystyczne cechy jakości wody wykorzystywanej do utrzymywania ryb (np. pH, twardość, temperatura, przewodność, stężenie rozpuszczonego tlenu);

— stężenie rozpuszczonego tlenu, pH, całkowita twardość, temperatura i przewodność roztworów do badań na początku badania i po upływie 96 godzin;

— metoda przygotowania roztworów podstawowych i roztworów do badań oraz częstotliwość wymiany;

▼M7

— uzasadnienie stosowania rozpuszczalnika i uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika, jeżeli jest inny niż woda;

— nominalne badane stężenia i wyniki wszystkich analiz ustalających stężenie badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych; należy również podać sprawność odzyskową metody i granicę oznaczalności;

— dowody, że próby kontrolne odpowiadają ogólnym kryteriom ważności w odniesieniu do przeżycia;

— wskaźnik zapłodnienia komórek jajowych;

— wskaźnik wylęgu w grupach badanych i w grupach kontrolnych.

Wyniki:

— maksymalne stężenie niepowodujące upadkowości w trakcie trwania badania;

— minimalne stężenie powodujące 100 % upadkowość w trakcie trwania badania;

— skumulowana upadkowość dla każdego stężenia przy zalecanych okresach obserwacji;

— wartości LC_{50} po 96 godzinach (i opcjonalnie po 48 godzinach) przy upadkowości wynoszącej 95 % granicy ufności, jeżeli jest to możliwe;

— wykres krzywej stężenie-upadkowość pod koniec badania;

— upadkowość w próbach kontrolnych (kontrola ujemna, wewnętrzna kontrola płytek, jak również kontrola dodatnia i ewentualna kontrola z rozpuszczalnikiem);

— dane dotyczące wyniku każdej z czterech obserwacji szczytowych;

— częstość występowania i opis anomalii morfologicznych i fizjologicznych, jeżeli jakiekolwiek występują (zob. przykłady przedstawione w dodatku 5 rys. 2);

— zdarzenia, które wystąpiły w trakcie prowadzenia badań, mogące mieć wpływ na wyniki;

— analiza statystyczna i przetwarzanie danych (analiza probitowa, model regresji logistycznej i średnia geometryczna dla LC_{50});

— nachylenie i granice ufności regresji (przekształconej) krzywej stężenie-odpowiedź.

Wszelkie odstępstwa od metody badawczej i odpowiednie wyjaśnienia.

Omówienie i interpretacja wyników.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: część I i część II. Seria dotycząca badań i oceny, nr 157, OECD, Paryż.

(2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: część I i część II (załączniki). Seria dotycząca badań i oceny nr 179, OECD, Paryż.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. i 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: s. 87–102.

(4) ISO (2007) Norma międzynarodowa Jakość wody – Oznaczanie ostrej toksyczności ścieków w odniesieniu do jaj danio pręgowanego (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna.

(5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: s. 38–48.

(6) Schulte, C. i Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. ATLA 22, s. 12–19.

(7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). Doktorat na Uniwersytecie Technicznym w Dreźnie, Niemcy.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. i 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: s. 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, s. 9690–9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. i Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: s. 97–102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. i Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: s. 401–406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. i 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: s. 878–882.

(13) Nguyen, L.T. i Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: s. 566–571.

(14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. i Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: s. 3024–3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. i 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), s. 196–209

(17) Rozdział C.4 niniejszego załącznika: „Szybka biodegradowalność”

(18) Rozdział C.29 niniejszego załącznika: „Szybka biodegradowalność CO_2 w szczelnie zamkniętych naczyniach”.

(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: s. 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: s. 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) Rozdział C.48 niniejszego załącznika: Krótkoterminowe badanie rozrodczości ryb. Zob. dodatek 4a.

(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, s. 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, s. 1676–1682.

(27) ISO (1996) Normy międzynarodowe. Jakość wody – Oznaczanie ostrej, letalnej toksyczności substancji w odniesieniu do ryby słodkowodnej [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Metoda przepływowa. Dostępne na stronie internetowej: [http://www.iso.org].

(28) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Seria dotycząca badań i oceny, nr 23, OECD, Paryż.

(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*). Wydanie piąte. Eugene, University of Oregon Press, Instytut Neuronauki, Stany Zjednoczone.

(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) Komisja Europejska (2007) Zalecenie Komisji 2007/526/WE z dnia 18 czerwca 2007 r. w sprawie wytycznych dotyczących trzymania zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych i innych celów naukowych i opieki nad tymi zwierzętami (notyfikowane jako dokument nr C(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:PL:PDF]

(33) Unia Europejska (2010) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:PL: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) Rozdział C.2 niniejszego załącznika: Badanie nagłego unieruchomienia 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) Norma międzynarodowa. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data, ISO/TS 20281. Dostępne na stronie internetowej: [http://www.iso.org].

(39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Seria dotycząca badań i oceny, nr 54. OECD, Paryż.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper „Fish embryo toxicity assays". Sprawozdanie UBA na mocy umowy nr 20385422, Niemiecka Federalna Agencja Ochrony Środowiska, Berlin. 298 s.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICJE

Szczytowy punkt końcowy: mający wpływ na poziomie populacji.

Blastula: formacja komórkowa wokół bieguna animalnego, która obejmuje pewną część żółtka.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Epibolia: rozległe rozrastanie się komórek, głównie nabłonkowych, w fazie gastrulacji embrionu i ich przemieszczanie się ze strony grzbietowej na brzuszną, wskutek którego warstwy komórek entodermalnych ulegają internalizacji w procesie podobnym do inwaginacji i żółtko zostaje włączone w embrion.

Badanie przepływowe: badanie, w którym podczas narażenia trwa ciągły przepływ roztworów do badań przez układ badawczy.

Wewnętrzna kontrola płytek: kontrola wewnętrzna składająca się z 4 dołków na płytce 24-dołkowej wypełnionych wodą rozcieńczającą, służąca do identyfikowania potencjalnego skażenia płytek przez producenta lub przez badacza podczas procedury oraz identyfikowania jakiegokolwiek wpływu płytki na wynik badania (np. gradientu temperatury).

IUPAC: Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej

Woda służąca do utrzymywania tarlaków: woda, w której prowadzony jest chów ryb dorosłych.

Średnie stężenie śmiertelne (LC_{50}): stężenie badanej substancji chemicznej szacowane jako stężenie śmiertelne dla 50 % organizmów doświadczalnych w trakcie badania.

Badanie półstatyczne z wymianą: badanie z regularną wymianą roztworów do badań po upływie określonego okresu (np. co 24 godziny).

SMILES: ang. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification* – uproszczony zapis struktury cząsteczek w postaci liniowej informacji tekstowej.

Somit: w rozwijającym się embrionie kręgowca somity są masami mezodermy rozmieszczonymi po obu stronach cewy nerwowej, z których ostatecznie wykształci się skóra właściwa (dermatom), mięśnie szkieletowe (miotom) i kręgi (sklerotom).

Badanie statyczne: badanie, w którym roztwory do badań pozostają bez zmian w trakcie całego badania.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

▼M7

Dodatek 2

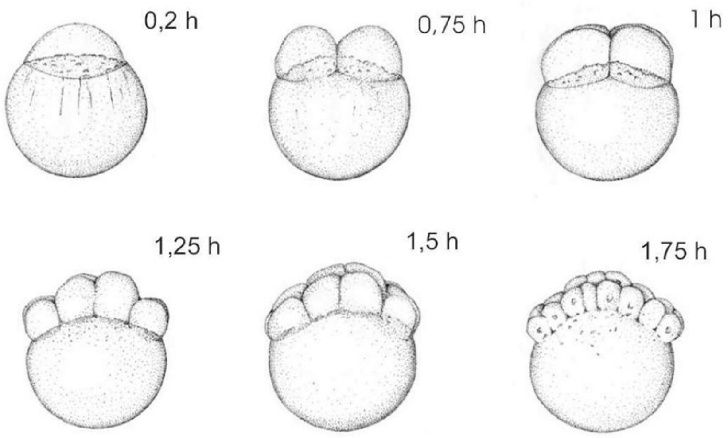
UTRZYMYWANIE I HODOWLA DANIO PRĘGOWANEGO ORAZ TYPOWE WARUNKI BADAŃ OSTREJ TOKSYCZNOŚCI NA EMBRIONACH DANIO PRĘGOWANEGO

Danio pręgowany (*Danio rerio*)		
Pochodzenie gatunku		Indie, Birma, Malakka, Sumatra
Dymorfizm płciowy		Samice: wystający brzuch, kiedy noszą jaja Samce: smuklejsza budowa ciała, pomarańczowy odcień pól pomiędzy niebieskimi wzdłużnymi pręgami (szczególnie widoczny przy płetwie odbytowej)
Schemat żywienia		sucha pasza w postaci płatków (maksymalnie 3 % masy ryby dziennie), podawana 3–5 razy dziennie; dodatkowo pływiki artemii (gatunków z rodzaju *Artemia*) lub małe dafnie odpowiedniej wielkości uzyskane z nieskażonego źródła. Podawanie żywego pokarmu stanowi urozmaicenie warunków bytowania, a zatem należy podawać żywy pokarm, kiedy tylko jest to możliwe. Aby zapewnić optymalną jakość wody, należy usuwać nadmiar paszy i odchody po około godzinie od karmienia.
Przybliżona masa dorosłych ryb		Samice: 0,65 ±0,13 g Samce: 0,5 ±0,1 g
Utrzymywanie ryb rodzicielskich	Oświetlenie	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum); 10–20 µE/m^2/s, 540–1080 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia); Fotoperiod trwający 12–16 godzin
	Temperatura wody	26 ±1 °C
	Jakość wody	Nasycenie O_2 ≥80 %, twardość: np. ~30–300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤48 mg/l, NH_4^+ i NO_2^-: <0,001 mg/l, chlor resztkowy <10 µg/l, całkowity chlor organiczny <25 ng/l, pH =6,5–8,5
	Dalsze kryteria jakości wody	Cząstki stałe <20 mg/l, całkowity węgiel organiczny <2 mg/l, całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych <50 ng/l, całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli <50 ng/l
	Rozmiar zbiornika do utrzymywania ryb	Np. 180 l, 1 ryba/l
	Oczyszczanie wody	Ciągłe (filtr węglowy); inne możliwości obejmują układy półstatyczne z wymianą wody lub system przepływowy z ciągłą wymianą wody
	Zalecany stosunek samców do samic na potrzeby hodowli	2:1 (lub masowe tarło)
Zbiorniki tarłowe		Np. 4-litrowe zbiorniki ze stalową siatką na dnie i sztuczną rośliną w charakterze bodźca do tarła; zewnętrzne maty grzewcze lub masowe tarło w zbiornikach do utrzymywania ryb
Struktura i wygląd jaj		Stabilna kosmówka (tj. jaja wysoce przezroczyste, niekleiste, o średnicy ~0,8–1,5 mm)
Liczba jaj składanych podczas tarła		Pojedyncza dojrzała samica składa co najmniej 50–80 jaj dziennie. W zależności od szczepu liczba jaj może być znacznie wyższa. Wskaźnik zapłodnienia jaj powinien wynosić ≥70 %. W przypadku ryb odbywających tarło po raz pierwszy wskaźnik zapłodnienia jaj może być niższy przez pierwszych kilka tareł.
Rodzaj badania		Statyczne, półstatyczne z wymianą, przepływowe, 26 ±1 °C, komory badawcze kondycjonowane przez 24 godziny (np. płytki 24-dołkowe o pojemności dołka równej 2,5–5 ml)

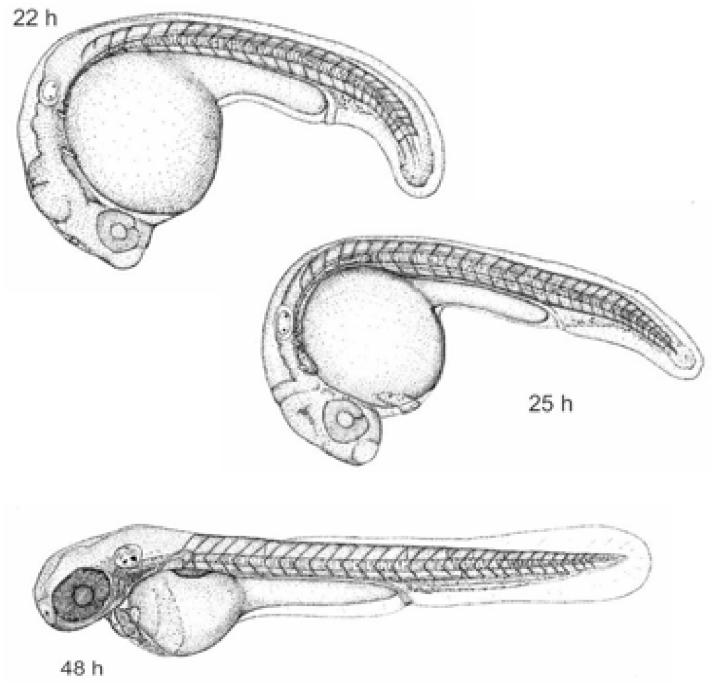
▼M7

Dodatek 3

NORMALNY ROZWÓJ DANIO PRĘGOWANEGO W TEMPERATURZE 26 °C

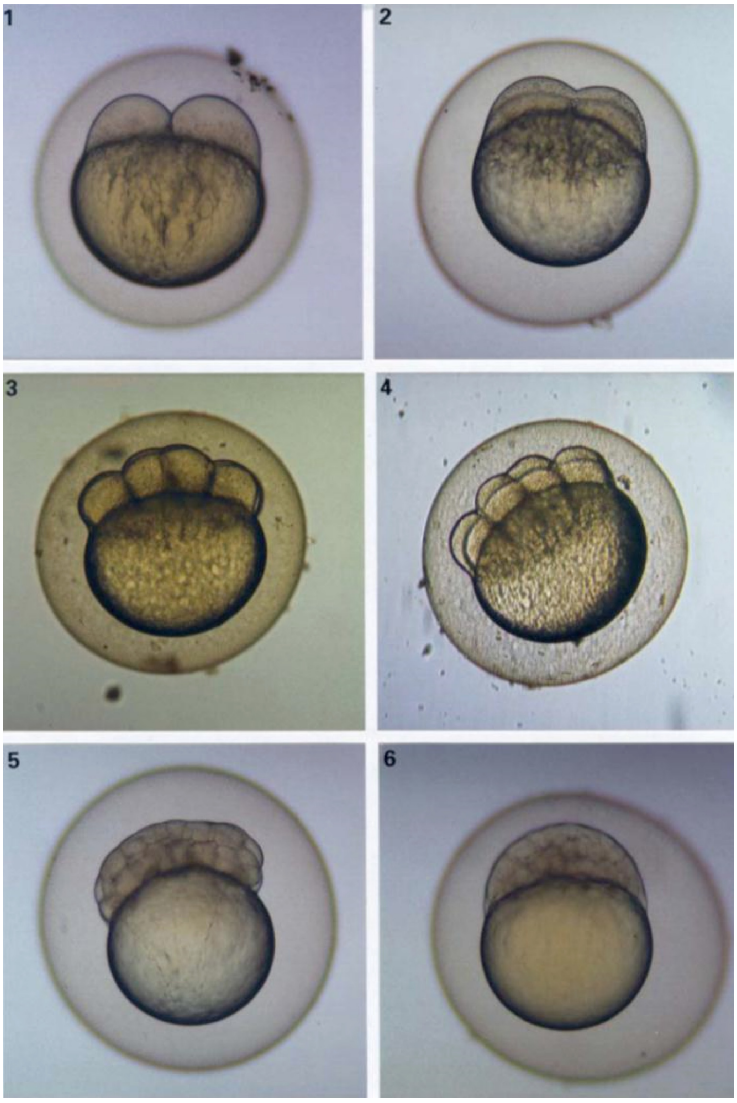


Rys. 1: Wybrane stadia wczesnego rozwoju danio pręgowanego (Danio rerio): 0,2–1,75 godzin od zapłodnienia (z: Kimmel *et al.*, 1995 (35)). Przebieg normalnego rozwoju w czasie można wykorzystać w diagnostyce zarówno zapłodnienia, jak i żywotności jaj (zob. pkt 26: Wybór zapłodnionych jaj).



Rys. 2: Wybrane stadia późnego rozwoju danio pręgowanego (Danio rerio) (embrion pozbawiony kosmówki w celu zoptymalizowania widoczności): 22–48 godzin po zapłodnieniu (z: Kimmel *et al.*, 1995 (35)).

▼M7



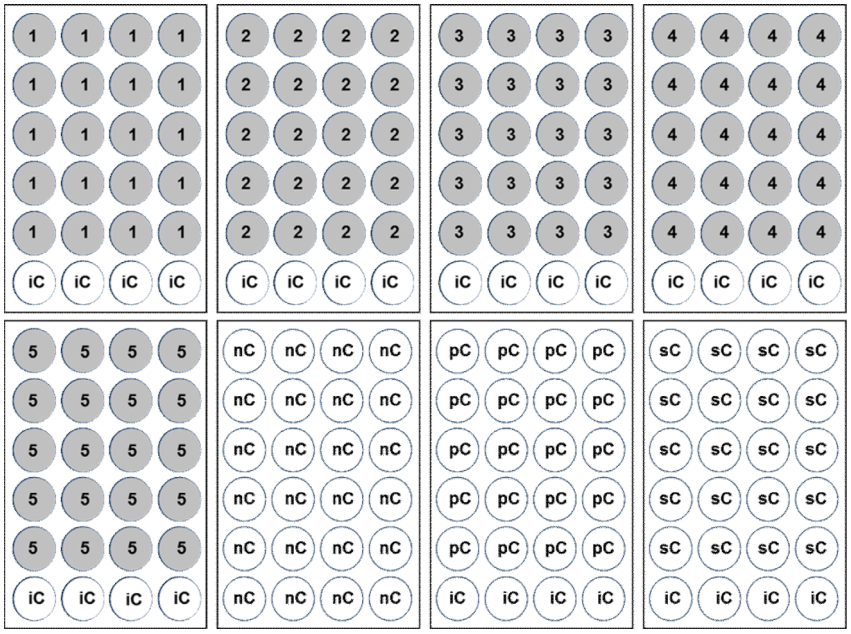
Rys. 3: Normalny rozwój embrionów danio pręgowanego (Danio rerio): 1) 0,75 godziny, etap 2-komórkowy; 2) 1 godzina, etap 4-komórkowy; 3) 1,2 godziny, etap 8-komórkowy; 4) 1,5 godziny, etap 16-komórkowy; 5) 4,7 godziny, początek epibolii; 6) 5,3 godziny, około 50 % epibolii (z: Braunbeck i Lammer 2006 (40)).

▼**M7**

Dodatek 4

Rys. 1

Rozkład płytek 24-dołkowych



1–5 = pięć badanych stężeń/substancja chemiczna;

nC = kontrola ujemna (woda rozcieńczająca);

iC = wewnętrzna kontrola płytek (z wodą rozcieńczającą);

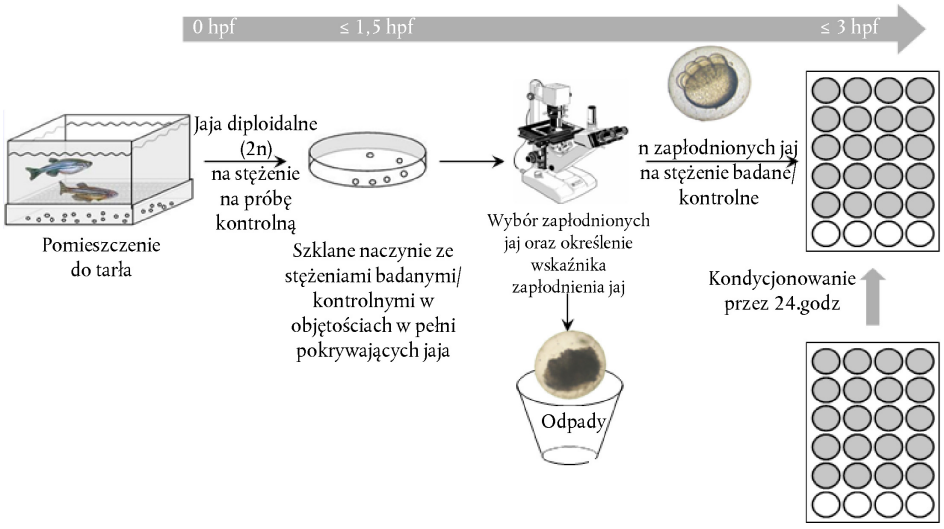
pC = kontrola dodatnia (4 mg 3,4-dichloroaniliny/l);

sC = kontrola z rozpuszczalnikiem

▼M7

Rys. 2

Schemat procedury badania ostrej toksyczności na embrionach danio pręgowanego (od lewej do prawej): złożenie jaj, zebranie jaj, wstępne narażenie niezwłocznie po zapłodnieniu w szklanych zbiornikach, selekcja zapłodnionych jaj za pomocą mikroskopu odwróconego lub dwuokularowego oraz rozmieszczenie zapłodnionych jaj na płytkach 24-dołkowych przygotowanych przy użyciu odpowiednich badanych stężeń / substancji kontrolnych, n = liczba jaj wymagana na jedno badane stężenie/kontrolę (w tym przypadku 20), hpf = liczba godzin od zapłodnienia.



▼M7

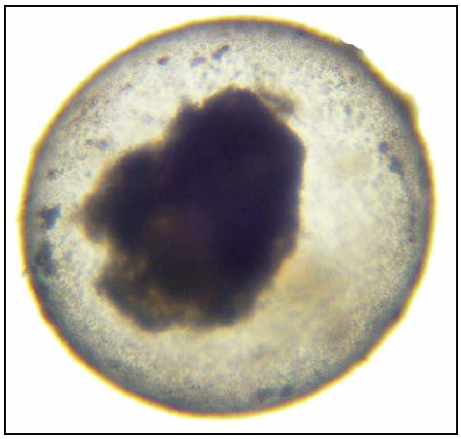
Dodatek 5

ATLAS LETALNYCH PUNKTÓW KOŃCOWYCH NA POTRZEBY BADANIA OSTREJ TOKSYCZNOŚCI NA EMBRIONACH DANIO PRĘGOWANEGO

Następujące szczytowe punkty końcowe wskazują na ostrą toksyczność i w konsekwencji śmierć embrionów: *koagulacja embrionu, nieodłączenie się ogona, niewytworzenie się somitów i brak bicia serca*. Do zilustrowania tych punktów końcowych wybrano poniższe obrazy mikrograficzne.

Rys. 1

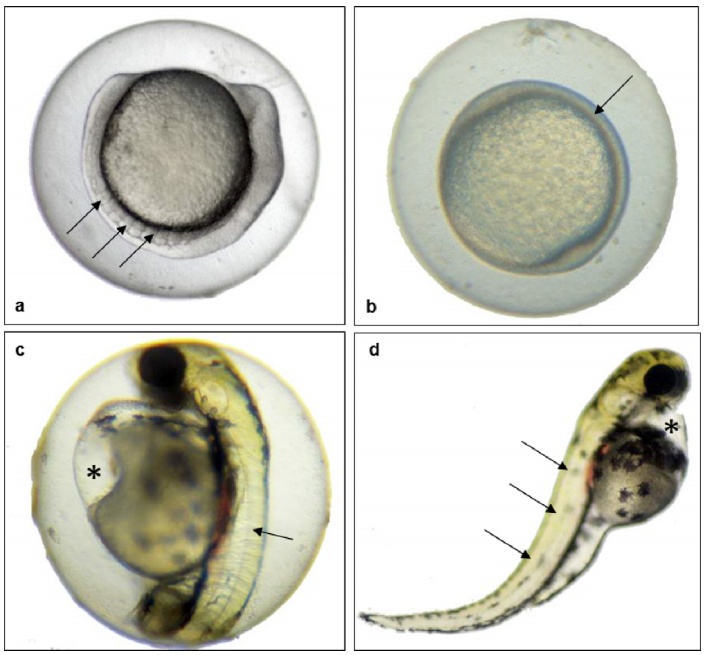
Koagulacja embrionu:



w jasnym oświetleniu pola w skoagulowanych embrionach danio pręgowanego widoczne są różne nieprzezierne wtrącenia.

Rys. 2:

Niewytworzenie się somitów:

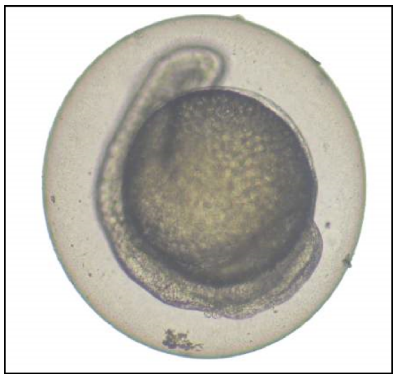


▼M7

na rys. a) u 24-godzinnego embrionu danio pręgowanego, mimo że jest opóźniony w rozwoju o ok. 10 godzin, widoczne są dobrze rozwinięte somity (→), natomiast embrion na rys. b) nie wykazuje żadnych oznak tworzenia się somitów (→). Na rys. c) u 48-godzinnego embrionu danio pręgowanego, mimo widocznego obrzęku woreczka żółtkowego, wyraźnie widać tworzenie się somitów (→), natomiast 96-godzinny embrion na rys. d) nie wykazuje żadnych oznak tworzenia się somitów (→). Należy również zwrócić uwagę na krzywiznę kręgosłupa (skoliozę) i obrzęk osierdzia (*) u embrionu na rys. d).

Rys. 3:

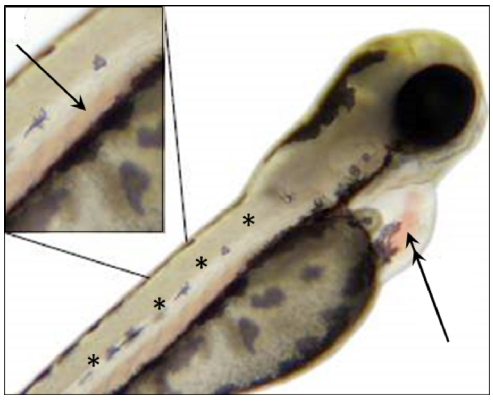
Nieodłączenie się pączka ogonowego



Widok boczny (a: →; 96-godzinny embrion danio pręgowanego). Należy również zwrócić uwagę na brak zawiązka oka (*).

Rys. 4:

Brak bicia serca



Brak bicia serca z oczywistych względów trudno jest przedstawić na obrazie mikrograficznym. Na brak bicia serca wskazuje brak skurczów serca (podwójna strzałka). Bezruch krwinek, np. w części brzusznej aorty (→ na wstawce), nie jest oznaką braku bicia serca. Należy również zwrócić uwagę na niewytworzenie się somitów w tym embrionie (*, raczej jednorodny niż segmentowy wygląd tkanek mięśniowych). Czas obserwacji w celu odnotowania braku bicia serca powinien wynosić co najmniej jedną minutę, przy czym należy zastosować powiększenie co najmniej 80-krotne.

▼M7

C.50 BADANIE TOKSYCZNOŚCI NA *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* W UKŁADZIE POZBAWIONYM OSADU

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 238 (2014). Służy ona do oceny toksyczności substancji chemicznych w stosunku do *Myriophyllum spicatum*, zanurzonej w wodzie rośliny dwuliściennej, gatunku z rodziny wodnikowatych. Metoda ta jest oparta na istniejącej metodzie badawczej ASTM (1) zmodyfikowanej do postaci układu badawczego pozbawionego osadu (2) na potrzeby szacowania wewnętrznej ekotoksyczności substancji chemicznych badanych (niezależnie od zachowania się badanej substancji chemicznej pod względem rozmieszczenia w wodzie i osadzie). Układ badawczy pozbawiony osadu charakteryzuje się niskim stopniem złożoności analitycznej (tylko w fazie wodnej), a uzyskane przy jego użyciu wyniki można analizować równolegle lub w porównaniu z wynikami uzyskanymi w ramach badania na gatunku *Lemna* (3); ponadto wymagane sterylne warunki pozwalają ograniczyć wpływ mikroorganizmów i glonów (wchłanianie/rozkład substancji chemicznej) do jak najniższego poziomu. Niniejsze badanie nie ma zastąpić innych badań toksyczności dla organizmów wodnych; powinno je raczej uzupełniać, tak aby możliwa była bardziej kompletna ocena zagrożeń i ryzyka, na jakie narażone są rośliny wodne. Niniejsza metoda badawcza została zweryfikowana w badaniu międzylaboratoryjnym (4).

2. Opisano szczegóły badania z wymianą (badanie półstatyczne) i bez wymiany (badanie statyczne) roztworu do badań. W zależności od celów badania oraz od wymogów regulacyjnych zaleca się zastosowanie metody półstatycznej, np. w przypadku substancji, które są szybko tracone z roztworu na skutek ulatniania się, adsorpcji, fotodegradacji, hydrolizy, strącania lub biodegradacji. Dalsze wskazówki przedstawiono w pozycji (5). Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do substancji, w przypadku których zweryfikowano metodę badawczą (zob. szczegółowe informacje na temat sprawozdania z badania międzylaboratoryjnego (4)), lub do postaci użytkowych lub znanych mieszanin; jeżeli badana jest mieszanina, jej składniki powinny być w miarę możliwości zidentyfikowane i oznaczone ilościowo. Metoda badania na *Myriophyllum spicatum* w układzie pozbawionym osadu uzupełnia badanie toksyczności na *Myriophyllum spicatum* w układzie woda-osad (6). Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej do badania mieszaniny na potrzeby celu regulacyjnego należy zastanowić się nad tym, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

ZASADA BADANIA

3. Stale rosnącym kulturom roślinnym *Myriophyllum spicatum* (tylko w zmodyfikowanej pożywce Andrewsa, zob. dodatek 2) pozwala się rosnąć w postaci monokultur przy różnych stężeniach badanej substancji chemicznej przez 14 dni w układzie badawczym pozbawionym osadu. Celem badania jest ilościowe określenie oddziaływań substancji chemicznej na wegetatywny wzrost w tym okresie na podstawie ocen wybranych zmiennych pomiarowych. Zmiennymi pomiarowymi są wzrost długości pędu, gałązek bocznych i korzeni, jak również zmiany mokrej masy i suchej masy oraz wzrost liczby okółków. Ponadto uwzględnia się charakterystyczne zmiany jakościowe w organizmach doświadczalnych, takie jak: zniekształcenie lub chloroza i nekroza, na które wskazuje żółknięcie lub białe i brązowe zabarwienie. Aby określić ilościowo skutki związane z substancją chemiczną, wzrost w roztworach do badań porównuje się ze wzrostem w grupach kontrolnych i wyznacza się stężenie powodujące zahamowanie wzrostu o określone x % i wyraża się je jako EC_x; „x” może mieć dowolną wartość w zależności od wymogów regulacyjnych, np. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Należy zauważyć, że szacunkowe wartości EC_{10} i EC_{20} są wiarygodne i odpowiednie jedynie w badaniach, w których współczynniki zmienności w roślinach z grupy kontrolnej są niższe od szacowanego poziomu wpływu, tj. w przypadku dokładnie oszacowanej wartości EC_{20} współczynniki zmienności powinny wynosić < 20 %.

4. Należy określić zarówno średnią właściwą szybkość wzrostu (oszacowaną na podstawie ocen długości pędu głównego i trzech dodatkowych zmiennych pomiarowych), jak i przyrost (oszacowany na podstawie zwiększenia długości pędu głównego i trzech dodatkowych zmiennych pomiarowych)

▼M7

roślin poddawanych i niepoddawanych działaniu substancji chemicznej. Właściwą szybkość wzrostu (r) i przyrost (y) wykorzystuje się następnie do określenia odpowiednio E_rC_x (np. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) i E_yC_x (np. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

5. Ponadto można statystycznie określić najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, (LOEC) oraz najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, (NOEC).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

6. Należy dysponować metodą analityczną zapewniającą należytą czułość pozwalającą na oznaczenie ilościowe badanej substancji chemicznej w pożywce użytej do badania. Informacje o badanej substancji chemicznej, które mogą być przydatne w ustaleniu warunków badania obejmują wzór strukturalny, czystość, zanieczyszczenia, rozpuszczalność w wodzie, stabilność w wodzie i świetle, stała dysocjacji w środowisku kwaśnym (pK_a), współczynnik podziału oktanol/woda (K_{ow}), prężność par oraz biodegradowalność. Rozpuszczalność w wodzie i prężność par mogą posłużyć do obliczenia stałej Henry'ego, która wskaże, czy istnieje prawdopodobieństwo znaczących strat badanej substancji chemicznej w okresie badania. Pomoże to stwierdzić, czy należy podjąć szczególne kroki w celu ograniczenia takich strat. W przypadku gdy informacje na temat rozpuszczalności i stabilności badanej substancji chemicznej są niepewne, zaleca się oceniać je w warunkach badania, *tj.* uwzględniając pożywkę, temperaturę i warunki oświetlenia, które mają być zastosowane w badaniu.

7. Kontrola pH pożywki użytej do badania jest szczególnie ważna np. gdy bada się metale lub substancje, które są hydrolitycznie nietrwałe. Dalsze wskazówki dotyczące badania substancji chemicznych o właściwościach fizykochemicznych utrudniających ich badanie podano w wytycznych OECD (5).

WAŻNOŚĆ BADANIA

8. Aby badanie było ważne, czas podwojenia długości pędu głównego w próbie kontrolnej musi być mniejszy niż 14 dni. W przypadku zastosowania pożywki i warunków badania opisanych w niniejszej metodzie badawczej, kryterium to można spełnić stosując warunki badania statycznego lub półstatycznego.

9. Średni współczynnik zmienności w odniesieniu do przyrostu opartego na pomiarach mokrej masy pędów (tj. od rozpoczęcia do zakończenia badania) oraz dodatkowe zmienne pomiarowe (zob. pkt 37) w kulturach kontrolnych nie przekraczają 35 % między kontrpróbami.

10. Ponad 50 % kontrprób grupy kontrolnej przechowuje się środowisku sterylnym przez cały okres narażenia wynoszący 14 dni, co oznacza, że są wyraźnie pozbawione zanieczyszczeń roznoszonych przez inne organizmy, takie jak glony, grzyby i bakterie (przejrzysty roztwór). *Uwaga*: Wytyczne dotyczące sposobu oceny sterylności przedstawiono w sprawozdaniu z badania międzylaboratoryjnego (4).

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

11. Sposobem sprawdzenia procedury badawczej może być zbadanie substancji chemicznych odniesienia, takich jak 3,5-dichlorofenol stosowany w badaniu międzylaboratoryjnym (4). z danych dotyczących badania międzylaboratoryjnego wynika, że średnie wartości EC_{50} 3,5-dichlorofenolu dla różnych zmiennych zależnych (zob. pkt 37–41 niniejszej metody badawczej) wynoszą od 3,2 mg/l do 6,9 mg/l (zob. sprawozdanie z badania międzylaboratoryjnego zawierające szczegółowe informacje na temat przedziałów ufności w odniesieniu do tych wartości). Wskazane jest badanie substancji chemicznej odniesienia co najmniej dwa razy do roku lub równolegle z określaniem toksyczności badanej substancji chemicznej, gdy badanie jest wykonywane z mniejszą częstotliwością.

▼M7

OPIS METODY

Aparatura

12. Cały sprzęt mający kontakt z pożywkami użytymi do badania powinien być wykonany ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału. Szklane naczynia używane do celów hodowli kultur i badania powinny być pozbawione zanieczyszczeń chemicznych, które mogłyby zostać wypłukane do pożywki użytej do badania, oraz powinny być sterylne. Naczynia badawcze powinny mieć dostateczną długość, tak aby pędy w naczyniach kontrolnych urosły w fazie wodnej, nieprzekraczając poziomu powierzchni pożywki użytej do badania na koniec badania. Zaleca się stosowanie próbówek badawczych o grubych ściankach ze szkła borokrzemianowego bez wywinięcia, o średnicy wewnętrznej wynoszącej około 20 mm i długości około 250 mm, z nakładkami aluminiowymi.

13. Ze względu na fakt, że zmodyfikowana pożywka Andrewsa zawiera sacharozę (która stymuluje wzrost grzybów i bakterii), roztwory do badań należy przygotowywać w sterylnych warunkach. Przed użyciem sterylizuje się wszystkie ciecze i sprzęt. Sterylizację przeprowadza się poprzez obróbkę ogrzanym powietrzem (210 °C) trwającą cztery godziny lub obróbkę w autoklawie trwającą 20 minut w temperaturze 121 °C. Ponadto wszystkie kolby, naczynia, miski itd. oraz inny sprzęt poddaje się opalaniu na sterylnym stole roboczym tuż przed użyciem.

14. Kultury i naczynia badawcze nie powinny być trzymane razem. Najłatwiej to osiągnąć, używając oddzielnych klimatycznych komór wzrostowych, inkubatorów lub pomieszczeń. Oświetlenie i temperatura powinny być regulowane i utrzymywane na stałym poziomie.

Organizm doświadczalny

15. *Myriophyllum spicatum* – zanurzona w wodzie roślina dwuliścienna – to gatunek z rodziny wodnikowatych. W okresie od czerwca do sierpnia niepozorne różowobiałe kwiaty wystają ponad powierzchnię wody. Rośliny są zakorzenione w gruncie przez system solidnych kłączy i można je znaleźć na całej półkuli północnej w eutroficznych, jednak niezanieczyszczonych i zawierających większe ilości wapnia wodach stojących na podłożu mulistym. *Myriophyllum spicatum* preferuje wodę słodką, ale występuje również w wodach słonych.

16. Do przeprowadzenia badania toksyczności w układzie pozbawionym osadu konieczne są sterylne rośliny. Jeżeli laboratorium badawcze nie posiada regularnych kultur *Myriophyllum spicatum* sterylny materiał roślinny można otrzymać z innego laboratorium, a (niesterylny) materiał roślinny można zebrać na określonym terenie lub może on zostać dostarczony przez dostawcę handlowego; jeżeli rośliny pochodzą z terenu należy zaplanować weryfikację taksonomiczną gatunków. Jeżeli rośliny zostały zebrane na określonym terenie lub zostały dostarczone przez dostawcę handlowego, przed użyciem należy je wysterylizować (1) i trzymać przez co najmniej osiem tygodni w kulturze w tej samej pożywce, co użyta do badania. Miejsca w terenie wykorzystane do zebrania kultur wyjściowych muszą być wolne od ewidentnych źródeł zanieczyszczenia. Należy zwrócić szczególną uwagę na zapewnienie, aby podczas zbierania *Myriophyllum spicatum* na określonym terenie, zwłaszcza w regionach, na których może krzyżować się z innymi gatunkami *Myriophyllum*, zebrano odpowiednie gatunki roślin. Jeżeli uzyskuje się je z innego laboratorium, należy przechowywać je w podobny sposób przez co najmniej trzy tygodnie. W sprawozdaniu należy zawsze podać źródło materiału roślinnego oraz gatunek wykorzystany do badania.

17. Jakość i jednorodność roślin wykorzystanych do badania będzie mieć znaczący wpływ na jego wynik i dlatego należy je starannie wybierać. Należy stosować młode, szybko rosnące roślin bez widocznych uszkodzeń lub odbarwień (chlorozy). Szczegółowe informacje na temat przygotowywania organizmów doświadczalnych znajdują się w dodatku 4.

Hodowla

18. Aby zmniejszyć częstotliwość prac w zakresie utrzymania kultur (np. gdy przez pewien okres nie planuje się badań nad *Myriophyllum*), kultury można utrzymywać w warunkach słabszego oświetlenia i obniżonej temperatury (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C). Szczegóły dotyczące hodowli kultur podano w dodatku 3.

▼M7

19. Co najmniej 14–21 dni przed badaniem dostateczną liczbę organizmów doświadczalnych przenosi się aseptycznie do świeżej sterylnej pożywki i przez 14–21 dni hoduje się kulturę w warunkach badania. Szczegółowe informacje na temat przygotowywania prekultury znajdują się w dodatku 4.

Pożywka użyta do badania

20. Zaleca się stosowanie pożywki składającej się tylko z jednego składnika odżywczego w odniesieniu do *Myriophyllum spicatum* w układzie badawczym pozbawionym osadu, jak opisano w dodatku 2. Do hodowli kultur i badania *Myriophyllum spicatum*, jak opisano w pkt (1), zalecana jest modyfikacja pożywki Andrewsa. Pięć oddzielnie przygotowanych roztworów podstawowych składników odżywczych z dodatkiem 3-procentowego roztworu sacharozy posłuży do utworzenia zmodyfikowanej pożywki Andrewsa. Szczegółowe informacje na temat przygotowywania pożywki znajdują się w dodatku 2.

21. Aby uzyskać roztwory do badań (w stosownych przypadkach poprzez rozcieńczenie), potrzebna jest zmodyfikowana pożywka Andrewsa o dziesięciokrotnie większym stężeniu. Skład tej pożywki podano w dodatku 2.

Roztwory do badań

22. Roztwory do badań przygotowuje się zazwyczaj przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej sporządza się zwykle przez rozpuszczenie substancji chemicznej w wodzie demineralizowanej (*tj.* destylowanej lub dejonizowanej). Dodawanie składników odżywczych będzie możliwe dzięki wykorzystaniu zmodyfikowanej pożywki Andrewsa o dziesięciokrotnie większym stężeniu.

23. Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej można poddać sterylizacji poprzez obróbkę w autoklawie trwającą 20 minut w temperaturze 121 °C lub poddać sterylizacji przez filtrowanie, pod warunkiem że stosowana technika sterylizacji nie denaturuje badanej substancji chemicznej. Roztwory do badań można również przygotować w sterylnej wodzie demineralizowanej lub pożywce w sterylnych warunkach. Podczas wybierania procedury sterylizacji roztworów podstawowych badanej substancji chemicznej należy uwzględnić stabilność termiczną i adsorpcję na różnych powierzchniach. W związku z tym zaleca się przygotowywanie roztworów podstawowych w warunkach sterylnych *tj.* stosując sterylny materiał do rozpuszczania badanej substancji chemicznej w warunkach sterylnych (np. sterylizacja w płomieniach, kaptury przepływowe itd.) i w wodzie sterylnej. Taka technika przygotowywania sterylnych roztworów podstawowych ma zastosowanie zarówno do substancji, jak i mieszanin.

24. Najwyższe badane stężenie badanej substancji chemicznej zwykle nie powinno przekraczać rozpuszczalności tej substancji w wodzie w warunkach badania. W przypadku badanych substancji chemicznych o słabej rozpuszczalności w wodzie może być konieczne przygotowanie stężonego roztworu podstawowego lub rozproszenie substancji chemicznej przy użyciu rozpuszczalnika organicznego lub środka dyspergującego, aby ułatwić dodanie precyzyjnych ilości badanej substancji chemicznej do pożywki użytej do badania oraz jej rozproszenie i rozpuszczenie. Należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć wykorzystania takich materiałów. Użycie pomocniczych rozpuszczalników lub środków dyspergujących nie powinno powodować fitotoksyczności. Na przykład do powszechnie używanych rozpuszczalników, które nie powodują fitotoksyczności w stężeniach do 100 µl/l, należą aceton i dimetyloformamid. W przypadku użycia rozpuszczalnika lub środka dyspergującego w sprawozdaniu należy podać jego stężenie końcowe, które powinno być utrzymane na minimalnym poziomie ($\leq$ 100 µl/l), i we wszystkich grupach badanych i grupach kontrolnych należy zachować takie samo stężenie rozpuszczalnika lub środka dyspergującego. Dalsze wskazówki na temat wykorzystania środków dyspergujących podano w pkt (5).

Grupy badane i kontrolne

25. W doborze odpowiednich badanych stężeń pomocna będzie uprzednia znajomość toksyczności badanej substancji chemicznej w stosunku do *Myriophyllum spicatum* z badania ustalającego zakres. Ostateczne badanie toksyczności powinno zwykle obejmować od pięciu (podobnie jak w przypadku badania zahamowania wzrostu *Lemna*, rozdział C.26 niniejszego załącznika) do siedmiu badanych stężeń uporządkowanych w postaci szeregu geometrycznego; należy je wybrać w celu ujęcia wartości NOEC i EC_{50} w zakresie stężeń (zob. poniżej).

▼M7

W miarę możliwości badane stężenia nie powinny się różnić o wielokrotność większą niż 3,2; można jednak zastosować większą wartość, gdy krzywa stężenie-odpowiedź jest płaska. Jeżeli użyto mniej niż pięć stężeń, należy podać uzasadnienie. Przy każdym badanym stężeniu należy zastosować co najmniej pięć kontrprób.

26. Przy ustalaniu zakresu badanych stężeń (w przypadku badania ustalającego zakres lub ostatecznego badania toksyczności) należy wziąć pod uwagę, co następuje:

aby określić EC_x, badane stężenia powinny obejmować swoim zakresem wartość EC_x w celu zapewnienia odpowiedniego poziomu ufności. Na przykład jeżeli oszacowuje się EC_{50}, to najwyższe badane stężenie powinno być większe od wartości EC_{50}. Jeżeli wartość EC_{50} leży poza zakresem badanych stężeń, to związane z tym przedziały ufności będą większe, a odpowiednia ocena statystycznego dopasowania modelu może nie być możliwa;

jeżeli celem jest oszacowanie LOEC/NOEC, to najniższe badane stężenie powinno być dostatecznie niskie, aby wzrost nie był znacząco mniejszy niż wzrost w grupie kontrolnej. Ponadto najwyższe badane stężenie powinno być dostatecznie wysokie, aby wzrost był znacząco mniejszy niż w grupie kontrolnej. Jeśli jest inaczej, badanie musi zostać powtórzone przy zastosowaniu innego zakresu stężeń (chyba że najwyższe stężenie równe jest granicznej rozpuszczalności lub maksymalnemu wymaganemu stężeniu granicznemu np. 100 mg/l).

27. Każde badanie powinno obejmować grupy kontrolne zawierające taką samą pożywkę, taki sam organizm doświadczalny (wybranie materiału roślinnego jak najbardziej jednorodnego, świeżych gałązek bocznych z prekultur, skróconych do długości 2,5 cm od podstawy) oraz takie same warunki otoczenia i procedury jak naczynia badawcze, lecz bez badanej substancji chemicznej. Jeżeli korzysta się z pomocniczego rozpuszczalnika lub środka dyspergującego, należy włączyć dodatkową grupę kontrolną z obecnością rozpuszczalnika/środka dyspergującego o tym samym stężeniu co w naczyniach z badaną substancją chemiczną. Liczba naczyń kontrolnych z kontrpróbą (oraz, w stosownym przypadku, naczyń z rozpuszczalnikiem) powinna wynosić co najmniej dziesięć.

28. Jeżeli wyznaczenie NOEC nie jest wymagane, plan badania można zmienić, zwiększając liczbę stężeń i zmniejszając liczbę kontrprób przypadających na stężenie. W każdym przypadku liczba kontrolnych kontrprób powinna wynosić jednak co najmniej dziesięć.

Narażenie

29. Świeże gałązki boczne z prekultury, skrócone do długości 2,5 cm od podstawy są losowo umieszczane w naczyniach badawczych w warunkach aseptycznych; każde naczynie badawcze powinno zawierać jedną gałąź boczną o długości 2,5 cm, która powinna mieć merystem wierzchołkowy na jednym końcu. Wybrany materiał roślinny powinien być tej samej jakości w każdym naczyniu badawczym.

30. Wymagany jest losowy plan umieszczania naczyń badawczych w inkubatorze, aby ograniczyć do minimum wpływ przestrzennych różnic światłości lub temperatury. Wymagany jest również zblokowany plan lub losowe przestawianie (lub częstsze przestawianie) naczyń podczas prowadzenia obserwacji.

31. Jeżeli ze wstępnego badania stabilności wynika, że nie można utrzymać stężenia badanej substancji chemicznej (*tj.* zmierzone stężenie spada poniżej 80 % zmierzonego stężenia początkowego) w czasie trwania badania (14 dni), zaleca się stosowanie badania półstatycznego. W takim przypadku rośliny należy wystawić na działanie świeżo przygotowanych roztworów

▼M7

do badań i roztworów kontrolnych co najmniej raz w trakcie badania (np. w 7. dniu). Częstotliwość narażenia na świeżą pożywkę będzie zależeć od stabilności badanej substancji chemicznej; do utrzymania prawie stałych stężeń wysoce niestabilnych lub lotnych substancji chemicznych może być wymagana większa częstotliwość.

32. Scenariusz narażenia poprzez nałożenie na liście (natrysk) nie jest objęty niniejszą metodą badawczą.

Warunki badania

33. Należy zastosować oświetlenie w postaci ciepłego lub chłodnego białego światła fluorescencyjnego w celu zapewnienia natężenia promieniowania z zakresu 100–150 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$, mierzonego jako promieniowanie fotosyntetycznie czynne (400–700 nm) w punktach o takiej samej odległości od źródła światła na dnie naczyń badawczych (równoważnym około 6 000–9 000 luksów) i przy użyciu cyklu dzień/noc odpowiadającego 16:8 godzinom. Na wartość pomiarową będzie mieć wpływ metoda detekcji i pomiaru światła, w szczególności typ czujnika. Nad czujniki jednokierunkowe przedkładane są czujniki sferyczne (które reagują na światło padające pod wszystkimi kątami powyżej i poniżej płaszczyzny pomiaru) oraz czujniki „kosinusowe" (które reagują na światło padające pod wszystkimi kątami powyżej płaszczyzny pomiaru) i dają wyższe odczyty w przypadku opisywanego tu typu wielopunktowego źródła światła.

34. Temperatura w naczyniach badawczych powinna wynosić 23 ± 2 °C. Dodatkowej uwagi wymaga dryft pH w szczególnych przypadkach, takich jak podczas badania nietrwałych substancji chemicznych lub metali; wartość pH powinna pozostawać w zakresie 6–9. Dalsze wskazówki przedstawiono w pozycji (5).

Czas trwania

35. Badanie zostaje zakończone po 14 dniach od przeniesienia roślin do naczyń badawczych.

Pomiary i oznaczenia analityczne

36. Na początku badania długość pędu głównego organizmu doświadczalnego wynosi 2,5 cm (zob. pkt 29); jest mierzona za pomocą linijki (zob. dodatek 4) lub fotografii i analizy obrazu. Długość pędu głównego organizmu doświadczalnego wydającego się wyglądać normalne lub nienormalne należy określić na początku badania, co najmniej raz w ciągu 14-dniowego okresu narażenia oraz na zakończenie badania. Uwaga: Osoby, które nie mają analizy obrazu, mogą zastosować rozwiązanie alternatywne – jeżeli stół roboczy jest sterylizowany przed umieszczeniem roślin w naczyniach badawczych, można również użyć jałowej linijki w celu zmierzenia długości pędu głównego na początku i w trakcie badania. Należy odnotować zmiany w rozwoju roślin, np. pod względem deformacji pędów, wyglądu, oznak martwicy, chlorozy, rozbicia lub utraty zdolności utrzymywania się na powierzchni wody oraz długości i wyglądu korzeni. Należy również odnotować istotne cechy pożywki użytej do badania (np. obecność nierozpuszczonego materiału, wzrost glonów, grzybów i bakterii w naczyniu badawczym).

37. Oprócz określenia długości pędu głównego w trakcie badania należy ocenić również wpływ badanej substancji chemicznej na trzy (lub więcej) z następujących zmiennych pomiarowych:

i. całkowita długość gałązek bocznych

ii. całkowita długość pędów

iii. całkowita długość korzenia

iv. mokra masa

v. sucha masa

vi. liczba okółków

▼M7

Uwaga 1: Obserwacje poczynione podczas badania ustalającego zakres mogą być pomocne w wyborze odpowiednich dodatkowych zmiennych pomiarowych spośród sześciu wymienionych powyżej.

Uwaga 2: Ustalenie mokrej i suchej masy (parametrów iv i v) jest wysoce pożądane.

Uwaga 3: Ze względu na fakt, że sacharoza i światło (narażenie korzeni na światło w trakcie badania) mogą mieć wpływ na nośniki transportu auksyny (roślinnego hormonu wzrostu) oraz że niektóre substancje chemiczne mogą działać podobnie do auksyny, uwzględnienie punktów końcowych dotyczących korzeni (parametr iii) budzi wątpliwości.

Uwaga 4: Wyniki badania międzylaboratoryjnego wskazują wysokie współczynniki zmienności (> 60 %) w odniesieniu do całkowitej długości gałązek bocznych (parametr i). Całkowita długość gałązek bocznych jest w każdym przypadku jest zresztą uwzględniona w pomiarze całkowitej długości pędów (parametr ii), który wykazuje bardziej akceptowalne współczynniki zmienności, wynoszące < 30 %.

Uwaga 5: Ze względu na powyższe rozważania zalecane główne punkty końcowe pomiarowe są następujące: całkowita długość pędów, mokra masa i sucha masa (parametry ii, iv i v); decyzję o użyciu parametru vi – liczby okółków – pozostawia się badaczowi.

38. Długość pędu głównego i liczba okółków mają tę zaletę, że mogą być określone dla każdego naczynia badawczego i kontrolnego na początku, podczas i na koniec badania na podstawie fotografii i analizy obrazu, chociaż można również posłużyć się w tym celu (jałową) linijką.

39. Całkowitą długość gałązek bocznych, całkowitą długość korzenia (jako sumę wszystkich gałązek bocznych lub korzeni) oraz całkowitą długość pędów (jako sumę długości pędu głównego i całkowitej długości gałązek bocznych) można zmierzyć za pomocą linijki na koniec okresu narażenia.

40. Suchą lub mokrą masę należy określić na początku badania na podstawie próbki prekultury reprezentatywnej dla tego, co jest użyte do rozpoczęcia badania, oraz na końcu badania przy użyciu materiału roślinnego z każdego naczynia badawczego i kontrolnego.

41. Całkowitą długość gałązek bocznych, całkowitą długość pędów, całkowitą długość korzenia, mokrą masę, suchą masę oraz liczbę okółków można ustalić w następujący sposób:

i. całkowita długość gałązek bocznych: długość gałązek bocznych można ustalić poprzez pomiar wszystkich gałązek bocznych za pomocą linijki na koniec okresu narażenia. Całkowita długość gałązek bocznych jest sumą długości wszystkich gałązek bocznych w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym;

ii. całkowita długość pędów: długość pędu głównego może ustalić przy użyciu analizy obrazu lub za pomocą linijki. Całkowita długość pędów jest sumą całkowitej długości gałązek bocznych i długości pędu głównego w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym na koniec okresu narażenia;

iii. całkowita długość korzenia: długość korzenia można ustalić poprzez pomiar wszystkich korzeni za pomocą linijki na koniec okresu narażenia. Całkowita długość korzenia jest sumą długości wszystkich korzeni w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym;

iv. mokra masa: mokrą masę można ustalić poprzez zważenie organizmów doświadczalnych na koniec okresu narażenia. Cały materiał roślinny z każdego naczynia badawczego i kontrolnego płucze się wodą destylowaną i osusza papierem celulozowym. Po tym przygotowaniu mokrą

▼M7

masę ustala się poprzez ważenie. Początkową biomasę (mokrą masę) określa się na podstawie próbki organizmów doświadczalnych pobranej z tej samej partii użytej do zaszczepienia naczyń badawczych;

v. sucha masa: po zakończeniu przygotowań na potrzeby ustalenia mokrej masy organizmy doświadczalne suszy się w temperaturze 60 °C do uzyskania stałej masy. Masa ta jest suchą masą. Początkową biomasę (suchą masę) określa się na podstawie próbki organizmów doświadczalnych pobranej z tej samej partii użytej do zaszczepienia naczyń badawczych;

vi. liczba okółków: liczone są wszystkie okółki wzdłuż pędu głównego.

Częstotliwość dokonywania pomiarów i oznaczeń analitycznych

42. Jeżeli zastosowany jest plan badania statycznego, należy zmierzyć pH każdej grupy badanej na początku i na końcu badania. Jeżeli zastosowany jest plan badania półstatycznego, należy zmierzyć pH w każdej partii „świeżego" roztworu do badań przed każdą wymianą oraz w odpowiednich „zużytych" roztworach.

43. Światłość należy zmierzyć w komorze wzrostowej, inkubatorze lub pomieszczeniu w różnych punktach o takiej samej odległości od źródła światła co organizmy doświadczalne. Pomiaru należy dokonać co najmniej raz w ciągu badania. Temperaturę pożywki w naczyniu zastępczym utrzymywanym w takich samych warunkach w komorze wzrostowej, inkubatorze lub pomieszczeniu należy rejestrować co najmniej codziennie (lub stale – przy użyciu rejestratora).

44. W trakcie badania stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w odpowiednich odstępach czasu. W badaniach statycznych minimalnym wymogiem jest oznaczenie stężeń na początku i na końcu badania.

45. W badaniach półstatycznych, w przypadku których nie oczekuje się, że stężenia badanych substancji chemicznych utrzymają się w granicach ± 20 % stężenia nominalnego, niezbędne jest przeprowadzenie analizy wszystkich świeżo przygotowanych roztworów do badań oraz tych samych roztworów przy każdej wymianie. W odniesieniu do tych badań, w których zmierzone stężenia początkowe badanych substancji chemicznych nie mieszczą się w granicach ± 20 % stężenia nominalnego, lecz można przedstawić wystarczające dowody wykazujące, że stężenia początkowe są powtarzalne i stabilne (tj. zawierają się w granicach 80–120 % stężenia początkowego), oznaczenia chemiczne można jednak przeprowadzać tylko przy najwyższych i najniższych badanych stężeniach. We wszystkich przypadkach oznaczenie badanych stężeń przed wymianą należy przeprowadzić tylko na jednym naczyniu z kontrpróbą dla każdego badanego stężenia (lub na połączonych zawartościach naczyń z kontrpróbą).

46. Jeżeli istnieją dowody, że badane stężenie zostało zadowalająco utrzymane w granicach ± 20 % nominalnego lub zmierzonego stężenia początkowego przez cały czas trwania badania, to analizę wyników można oprzeć na nominalnych lub zmierzonych wartościach początkowych. Jeżeli odchylenie od nominalnego lub zmierzonego stężenia początkowego nie mieści się w zakresie ± 20 %, to analizę wyników należy oprzeć na średniej geometrycznej stężenia podczas narażenia lub na modelach opisujących spadek stężenia badanej substancji chemicznej (5).

Badanie graniczne

47. W niektórych okolicznościach, na przykład gdy badanie wstępne wskazuje, że badana substancja chemiczna nie ma efektów toksycznych w stężeniach do 100 mg/l lub do jej rozpuszczalności granicznej w pożywce użytek do badania, lub – w przypadku postaci użytkowej – do jej dyspergowalności granicznej, można przeprowadzić badanie graniczne polegające na porównaniu reakcji w grupie kontrolnej i jednej grupie badanej (przy stężeniu 100 mg/l lub równym granicznej rozpuszczalności). Zdecydowanie zaleca się,

▼M7

aby takie badanie było poparte analizą stężenia ekspozycyjnego. Do badania granicznego stosują się wszystkie wcześniej opisane warunki badania i kryteria ważności, z tym że liczba badanych kontrprób powinna zostać podwojona. Wzrost w grupie kontrolnej i grupie badanej można poddać analizie przy użyciu testu statystycznego do porównywania średnich, np. testu t-Studenta.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Zmienne zależne

48. Celem badania jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na wzrost wegetatywny *Myriophyllum spicatum*. Niniejsza metoda badawcza służy opisaniu dwóch zmiennych zależnych.

a) Średnia właściwa szybkość wzrostu: tę zmienną zależną oblicza się na podstawie zmian logarytmów długości pędu głównego, a ponadto na podstawie zmian logarytmów innych parametrów pomiarowych, tj. całkowitej długości pędów, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków, w czasie (wyrażonych na dzień) w grupach kontrolnych i w każdej grupie badanej. Uwaga: W odniesieniu do parametrów pomiarowych dotyczących całkowitej długości gałązek bocznych i całkowitej długości korzenia obliczenie średniej właściwej szybkości wzrostu nie jest możliwe. Na początku badania organizm doświadczalny nie ma żadnych gałązek bocznych ani korzeni (jak wynika z przygotowania prekultury); gdy wartość początkowa wynosi zero, obliczenie średniej właściwej szybkości wzrostu nie jest określone.

b) Przyrost: tę zmienną zależną oblicza się na podstawie zmian długości pędu głównego, a ponadto na podstawie zmian innych parametrów pomiarowych, tj. najlepiej całkowitej długości pędów, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków, oraz innych parametrów, jeżeli zostaną uznane za przydatne, w grupach kontrolnych i w każdej grupie badanej aż do końca badania.

49. Oszacowania toksyczności powinny być oparte na długości pędu głównego oraz na trzech dodatkowych zmiennych pomiarowych (tj. najlepiej całkowitej długości pędów, mokrej masie, suchej masie lub liczbie okółków, zob. pkt 37 oraz uwagi 2, 4 i 5 do tego punktu), ponieważ niektóre substancje chemiczne mogą mieć znacznie większy wpływ na inne zmienne pomiarowe niż na długość pędu głównego. Skutek ten nie zostałby wykryty przy obliczeniu jedynie długości pędu głównego.

Średnia właściwa szybkość wzrostu

50. Średnią właściwą szybkość wzrostu dla konkretnego okresu oblicza się jako logarytmiczny przyrost zmiennych wzrostu – długości pędu głównego oraz trzech dodatkowych zmiennych pomiarowych (tj. całkowitej długości pędów, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków) – dla każdej kontrpróby kontrolnej i dla każdej grupy badanej, stosując w tym celu poniższy wzór:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

gdzie:

μ_{i-j}: średnia właściwa szybkość wzrostu od czasu i do czasu j,

N_i: zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie i,

N_j: zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie j,

t: czas mierzony od i do j.

▼M7

Dla każdej grupy badanej i kontrolnej należy wyliczyć średnią wartość szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji.

51. Średnią właściwą szybkość wzrostu należy obliczyć dla całego okresu badania (czas „i" w powyższym równaniu jest początkiem badania, a czas „j" jest końcem badania). Dla każdego badanego stężenia i dla każdej grupy kontrolnej należy obliczyć średnią wartość średniej właściwej szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji. Ponadto należy ocenić szybkość wzrostu dla poszczególnych odcinków, aby określić wpływ badanej substancji chemicznej występujący w okresie narażenia (np. przez badanie krzywych wzrostu przekształconych na postać logarytmiczną).

52. Następnie można obliczyć procentowe zahamowanie szybkości wzrostu (I_r) dla każdego badanego stężenia (grupy badanej) zgodnie z poniższym wzorem:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

gdzie:

% Ir: procentowe zahamowanie średniej właściwej szybkości wzrostu

μC: średnia wartość μ w grupie kontrolnej

μT: średnia wartość μ w grupie badanej

Przyrost

53. Wpływ na przyrost określa się na podstawie zmiennej pomiarowej, którą jest długość pędu głównego, oraz trzech dodatkowych zmiennych pomiarowych (tj. najlepiej całkowitej długości pędów, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków) obecnych w każdym naczyniu badawczym na początku i na końcu badania. Dla suchej masy lub mokrej masy początkową biomasę określa się na podstawie próbki organizmów doświadczalnych pobranej z tej samej partii użytej do zaszczepienia naczyń badawczych. Dla każdego badanego stężenia i próby kontrolnej należy obliczyć średnią wartość przyrostu wraz z oszacowaniami wariancji. Średnie procentowe zahamowanie przyrostu (% I_y) można obliczyć dla każdej grupy badanej w następujący sposób:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

gdzie:

% Iy: procentowe zmniejszenie przyrostu

bC: biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy kontrolnej

bT: biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy badanej

Czas podwojenia

54. Aby określić czas podwojenia (T_d) długości pędu głównego oraz spełnienie przez badanie tego kryterium ważności (zob. pkt 8), używa się poniższego wzoru z danymi uzyskanymi z naczyń kontrolnych:

$T_d = \ln 2/\mu$

gdzie μ to średnia właściwa szybkość wzrostu wyznaczona w sposób opisany w pkt 50–52.

▼M7

Wykreślanie krzywych stężenie-odpowiedź

55. Należy wykreślić krzywe stężenie-odpowiedź wiążące średnie procentowe zahamowanie zmiennej zależnej (I_r lub I_y obliczone w sposób wskazany w pkt 53) i logarytm stężenia badanej substancji chemicznej.

Oszacowanie EC_x

56. Oszacowania EC_x powinny być oparte zarówno na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_rC_x), jak i na przyroście (E_yC_x), przy czym każdy z tych parametrów powinien być z kolei oparty na długości pędu głównego oraz ewentualnie na dodatkowych zmiennych pomiarowych (tj. najlepiej na całkowitej długości pędów, mokrej masie, suchej masie lub liczbie okółków). Wynika to stąd, że istnieją takie substancje chemiczne, które wywierają różny wpływ na długość pędu głównego i inne zmienne pomiarowe. Pożądanymi parametrami toksyczności są więc cztery wartości EC_x dla każdego obliczonego poziomu zahamowania x: E_rC_x (długość pędu głównego); E_rC_x (tj. najlepiej całkowita długość pędów, mokra masa, sucha masa lub liczba okółków). E_yC_x (długość pędu głównego); oraz E_yC_x (tj. najlepiej całkowita długość pędów, mokra masa, sucha masa lub liczba okółków).

57. Należy zauważyć, że wartości EC_x obliczone przy użyciu tych dwóch zmiennych zależnych nie są porównywalne i różnicę tę należy uwzględnić przy wykorzystywaniu wyników badania. Jeżeli spełnione są warunki badania określone w niniejszej metodzie badawczej, wartości EC_x oparte na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_rC_x) będą w większości przypadków wyższe od wyników opartych na przyroście (E_yC_x) ze względu na podstawę matematyczną tych podejść. Nie należy interpretować tego jako różnicy we wrażliwości pomiędzy tymi dwiema zmiennymi zależnymi, lecz jedynie jako stwierdzenie, że wartości te są różne pod względem matematycznym.

Procedury statystyczne

58. Celem jest uzyskanie ilościowej zależności stężenie-odpowiedź za pomocą analizy regresji. Możliwe jest zastosowanie ważonej regresji liniowej po przeprowadzeniu transformacji linearyzującej danych dotyczących reakcji – na przykład do modelów probit, logit albo Weibulla (7), lecz preferowane są procedury regresji nieliniowej, które lepiej sprawdzają się w przypadku nieuniknionych nieregularności danych i odchyleń od wyrównanych rozkładów. Przy zbliżaniu się do zerowego albo całkowitego zahamowania nieregularności takie mogą zostać powiększone przez transformację, zakłócając analizę (7). Należy zwrócić uwagę, że standardowe metody analizy przy użyciu transformat probit, logit albo Weibulla są przeznaczone do stosowania do danych binarnych (np. dotyczących upadkowości lub przeżywalności) i powinny zostać zmodyfikowane, aby uwzględnić dane dotyczące szybkości wzrostu lub przyrostu. Szczegółowe procedury wyznaczania wartości EC_x na podstawie ciągłych danych można znaleźć w (8) (9) (10).

59. Dla każdej zmiennej zależnej, która ma być analizowana, należy zastosować zależność stężenie-odpowiedź do obliczenia oszacowań punktowych wartości EC_x. W miarę możliwości dla każdego oszacowania należy określić granice ufności na poziomie 95 %. Zgodność danych reakcji z modelem regresji należy ocenić graficznie lub statystycznie. Analizę regresji należy przeprowadzić z zastosowaniem reakcji z poszczególnych kontrprób, a nie średnich z grup badanych.

60. Oszacowania wartości EC_{50} i granice ufności można również otrzymać przy użyciu interpolacji liniowej z zastosowaniem metody bootstrap (10), jeżeli dostępne modele/metody regresji są nieodpowiednie dla danych.

61. W celu oszacowania LOEC, a następnie NOEC konieczne jest porównanie średnich z grup badanych przy użyciu technik analizy wariancji (ANOVA). Średnią dla każdego stężenia następnie porównuje się ze średnią kontrolną przy użyciu odpowiedniej metody wielokrotnego porównania lub testu trendu. Przydatny może być test Dunnetta lub Williamsa (12) (13) (14) (15) (16). Należy ocenić, czy przyjęte w ANOVA założenie jednorodności

▼M7

wariancji pozostaje ważne. Ocenę tę można przeprowadzić graficznie albo za pomocą formalnego testu (15). Odpowiednimi do tego celu testami są testy Levene'a lub Bartletta. Niespełnienie założenia o jednorodności wariancji można niekiedy skorygować za pomocą transformacji logarytmicznej danych. Jeżeli heterogeniczność wariancji jest ekstremalna i nie można jej skorygować przez transformację, należy rozważyć analizę za pomocą takich metod jak regresyjne testy Jonckheere'a. Dodatkowe wskazówki dotyczące wyznaczania NOEC można znaleźć w (10).

62. Najnowsze osiągnięcia naukowe doprowadziły do tego, że zaleca się odstąpienie od stosowania pojęcia NOEC i zastąpienie go opartymi o regresję oszacowaniami punktowymi wartości EC_x. Dla niniejszego badania nad wywłócznikiem nie ustalono odpowiedniej wartości x. Wydaje się jednak, że odpowiedni jest przedział 10–20 % (w zależności od wybranej zmiennej zależnej), a najlepiej należy podać zarówno EC_{10}, jak i EC_{20} oraz ich granice ufności.

Sprawozdawczość

63. Sprawozdanie z badania zawiera następujące informacje.

Badana substancja chemiczna

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub nazwa CAS, numer CAS, identyfikator SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp. (w tym w stosownych przypadkach zawartość węgla organicznego);

Substancja wieloskładnikowa, UVCB lub mieszanina:

— opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Gatunek doświadczalny

— nazwa systematyczna i źródło.

Warunki badania

— stosowana procedura badawcza (statyczna lub półstatyczna);

— data rozpoczęcia badania i czas jego trwania;

— pożywka użyta do badań;

— opis układu doświadczalnego: naczynia badawcze i przykrywki, objętości roztworów, długość pędu głównego w naczyniu badawczym na początku badania;

— badane stężenia (nominalne i zmierzone, w stosownych przypadkach) oraz liczba kontrprób na stężenie;

— metody przygotowywania roztworów podstawowych i roztworów do badań, w tym zastosowanie jakichkolwiek rozpuszczalników lub środków dyspergujących;

— temperatura podczas badania;

— źródło światła, światłość i jednorodność światła;

— wartości pH pożywki użytej do badań i pożywki kontrolnej;

— metoda analizy badanej substancji chemicznej wraz z odpowiednimi danymi oceny jakości (badania walidacyjne, odchylenia standardowe lub granice ufności analiz);

▼M7

— metody określania długości pędu głównego i innych zmiennych pomiarowych, np. całkowitej długości gałązek bocznych, całkowitej długości pędów, całkowitej długości korzenia, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków;

— stan kultury (sterylny lub niesterylny) w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym przy każdej obserwacji;

— wszelkie odstępstwa od niniejszej metody badawczej.

Wyniki

— dane pierwotne: długość pędu głównego oraz inne zmienne pomiarowe w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym podczas każdej obserwacji i analizy;

— średnie i odchylenia standardowe dla każdej zmiennej pomiarowej;

— krzywe wzrostu dla każdej zmiennej pomiarowej;

— obliczone zmienne zależne dla każdej kontrpróby poddanej działaniu substancji chemicznej wraz z wartościami średnimi i współczynnikiem zmienności dla kontrprób;

— graficzne przedstawienie zależności stężenie/skutek;

— oszacowania toksycznych punktów końcowych dla zmiennych zależnych, np. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, oraz związane z nimi przedziały ufności. LOEC i NOEC, jeżeli zostały obliczone, oraz metody statystyczne użyte do ich wyznaczenia;

— jeżeli zastosowano ANOVA – wielkość wpływu, który można wykryć (np. najmniejsza znacząca różnica);

— wszelka stymulacja wzrostu stwierdzona w którejkolwiek próbie poddanej działaniu substancji chemicznej;

— wszelkie wizualne oznaki fitotoksyczności, jak również obserwacje roztworów do badań;

— omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

(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,* nr 22, s. 702–710.

(3) Rozdział C.26 niniejszego załącznika*: Badanie inhibicji wzrostu u Lemna sp.*

(4) OECD (2014), „*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system", Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 205, OECD Publishing, Paryż.

(5) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 23, OECD Publishing, Paryż.

(6) Rozdział C.51 niniejszego załącznika: Badanie toksyczności na *Myriophyllum spicatum* w układzie woda-osad

▼**M7**

(7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, t. 18/9, s. 713–718.

(8) Nyholm, N. *et al.* (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, t. 11/2, s. 157–167.

(9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, t. 11/10, s. 1485–1494.

(10) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 54, OECD Publishing, Paryż.

(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*, t. 50/272, s. 1096–1121.

(13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, t. 20/3, s. 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*, t. 27/1, s. 103–117.

(15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, t. 28/2, s. 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*, t. 29/2, s. 93–96.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICJE

Biomasa oznacza mokrą lub suchą masę materii żywej obecnej w populacji. W niniejszym badaniu biomasa stanowi sumę mas pędu głównego, wszystkich gałązek bocznych i wszystkich korzeni.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Chloroza oznacza zmianę barwy organizmu doświadczalnego, w szczególności okółków, z zielonej na żółciejącą.

ECx oznacza stężenie badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w pożywce użytej do badań, powodujące ograniczenie wzrostu *Myriophyllum spicatum* o x % (np. o 50 %) w określonym okresie narażenia (który należy dokładnie określić, jeżeli odbiega od pełnego lub zwykłego czasu trwania badania). Aby jednoznacznie oznaczyć wartość EC wynikającą z szybkości wzrostu albo przyrostu, w odniesieniu do szybkości wzrostu używa się symbolu „E_rC”, a w odniesieniu do przyrostu – symbolu „E_yC”, po którym następuje użyta zmienna pomiarowa, np. E_rC (długość pędu głównego).

Wzrost oznacza wzrost wartości zmiennej pomiarowej, np. długości pędu głównego, całkowitej długości gałązek bocznych, całkowitej długości pędów, całkowitej długości korzenia, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków, w okresie badania.

Szybkość wzrostu (średnia właściwa szybkość wzrostu) oznacza logarytmiczny wzrost wartości zmiennej pomiarowej w okresie narażenia. *Uwaga*: zmienne zależne związane z szybkością wzrostu są niezależne od czasu trwania badania, o ile przebieg wzrostu organizmów kontrolnych nienarażonych na działanie substancji jest wykładniczy.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, (LOEC) oznacza najniższe badane stężenie, przy którym obserwuje się, że substancja chemiczna ma statystycznie istotny wpływ na ograniczenie wzrostu (przy $p < 0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną w danym czasie narażenia. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC powinny wywierać szkodliwy skutek równy skutkom lub większy niż skutki obserwowane przy LOEC. W przypadku gdy oba warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC).

Zmienne pomiarowe oznaczają dowolnego typu zmienne, które mierzy się, aby wyrazić punkt końcowy przy użyciu jednej zmiennej zależnej lub większej ich liczby. W niniejszej metodzie badawczej długość pędu głównego, całkowita długość gałązek bocznych; całkowita długość pędów, całkowita długość korzenia, mokra masa, sucha masa oraz liczba okółków stanowią zmienne pomiarowe.

Monokultura oznacza kulturę z jednym gatunkiem rośliny.

Nekroza oznacza martwą (tj. barwy białej lub ciemnobrązowej) tkankę organizmu doświadczalnego.

Najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, (NOEC) oznacza badane stężenie bezpośrednio poniżej LOEC.

Zmienna zależna oznacza zmienną służącą do szacowania toksyczności, uzyskaną z dowolnych zmierzonych zmiennych opisujących biomasę za pomocą różnych metod obliczania. W przypadku niniejszej metody badawczej szybkość wzrostu i przyrost są zmiennymi zależnymi wyprowadzonymi ze zmiennych pomiarowych, takich jak: długość pędu głównego, całkowita długość pędów, mokra masa, sucha masa czy liczba okółków.

Badanie półstatyczne (z wymianą) oznacza badanie, w którym roztwór do badań jest okresowo wymieniany w określonych odstępach czasu w trakcie badania.

Badanie statyczne oznacza metodę badawczą bez wymiany roztworu do badań w trakcie badania.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

▼M7

Punkt końcowy badania opisuje ogólny czynnik, który będzie ulegał zmianie pod wpływem badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną, jako cel badania. W niniejszej metodzie badawczej punktem końcowym badania jest zahamowanie wzrostu, które można wyrazić za pomocą różnych zmiennych zależnych opartych na jednej zmiennej pomiarowej lub większej ich liczbie.

Pożywka użyta do badań oznacza kompletną syntetyczną pożywkę, na której wzrastają rośliny wykorzystywane do badań, gdy są narażone na działanie badanej substancji chemicznej. Badana substancja chemiczna jest zwykle rozpuszczona w pożywce użytej do badania.

UVCB oznacza substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

Przyrost oznacza wartość zmiennej pomiarowej wyrażającą biomasę na końcu okresu narażenia pomniejszoną o wartość zmiennej pomiarowej na początku okresu narażenia. Uwaga: jeżeli przebieg wzrostu organizmów nienarażonych na działanie substancji jest wykładniczy, wartość zmiennych zależnych opartych na przyroście będzie ulegała zmniejszeniu wraz z upływem czasu trwania badania.

▼M7

Dodatek 2

ZMODYFIKOWANA POŻYWKA ANDREWSA DLA KULTURY WYJŚCIOWEJ I PREKULTURY

Pięć oddzielnie przygotowanych roztworów podstawowych składników odżywczych z dodatkiem 3-procentowego roztworu sacharozy posłuży do przygotowania zmodyfikowanej pożywki Andrewsa wymaganej na potrzeby kultury wyjściowej i prekultury.

Tabela 1

Skład substancji biogennej Andrewsa: (norma ASTM E 1913-04)

Wytwarzanie roztworu podstawowego składników odżywczych			Wytwarzanie substancji biogennej
Roztwór podstawowy	Substancja chemiczna	Masa początkowa na 1 000 ml	ml na 5 l substancji biogennej
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	Zob. roztwór podstawowy 3.1 poniżej		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	

Roztwory podstawowe można przechowywać w lodówce przed okres 6 miesięcy (w temperaturze 5–10 °C). Wyłącznie roztwór podstawowy nr 5 charakteryzuje się ograniczonym okresem przechowywania (dwa miesiące).

Tabela 2

Wytwarzanie roztworu podstawowego 3.1 na potrzeby przygotowania roztworu podstawowego 3

Substancja chemiczna	Masa początkowa w 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

Po wytworzeniu roztworu podstawowego 3.1 (tabela 2), roztwór ten należy głęboko zamrozić w podwielokrotnościach wynoszących około 11 ml (co najmniej w temperaturze -18 °C). Okres przechowywania głęboko zamrożonych porcji wynosi pięć lat.

Aby wytworzyć roztwór podstawowy 3, należy rozmrozić roztwór podstawowy 3.1, a następnie przelać 10 ml tego roztworu do kolby miarowej o pojemności 1 l i uzupełnić wodą o bardzo wysokiej czystości aż do uzyskania pojemności oznaczonej na kolbie.

Aby uzyskać zmodyfikowaną pożywkę Andrewsa, należy wlać około 2 500 ml wody o bardzo wysokiej czystości do kolby miarowej o pojemności 5 l. Po dodaniu 50 ml każdego roztworu podstawowego kolbę miarową należy wypełnić do 90 % objętości wodą o bardzo wysokiej czystości i zmienić pH, by jego wartość wynosiła 5,8.

▼M7

Następnie należy dodać 150 g rozpuszczonej sacharozy (3 % na 5 l), po czym należy wypełnić kolbę miarową wodą o bardzo wysokiej czystości do oznaczonej objętości. Na koniec substancję biogenną wlewa się do kolb Schotta i poddaje działaniu autoklawu w temperaturze 121 °C przez 20 minut.

Uzyskaną w ten sposób substancję biogenną można przechowywać w środowisku sterylnym w lodówce (w temperaturze 5–10 °C) przez trzy miesiące.

Zmodyfikowana pożywka Andrewsa służąca do badania toksyczności w układzie pozbawionym osadu

Pięć roztworów podstawowych składników odżywczych z dodatkiem 30-procentowej sacharozy, o których wspomniano już w tabelach 1 i 2, posłuży do przygotowania dziesięciokrotnie stężonej zmodyfikowanej pożywki Andrewsa niezbędnej do uzyskania roztworów do badań. W tym celu do kolby miarowej o pojemności 1 l należy wlać około 100 ml wody o bardzo dużej czystości. Po dodaniu 100 ml każdego roztworu podstawowego należy zmienić pH, by jego wartość wynosiła 5,8. Następnie należy dodać 30-procentową rozpuszczoną sacharozę (300 g na 1 000 ml); po czym należy wypełnić kolbę miarową wodą o bardzo wysokiej czystości do oznaczonej objętości.

Na koniec substancję biogenną wlewa się do kolb Schotta o pojemności 0,5 l i poddaje działaniu autoklawu w temperaturze 121 °C przez 20 minut.

Uzyskaną w ten sposób dziesięciokrotnie skoncentrowaną zmodyfikowaną substancję biogenną można przechowywać w środowisku sterylnym w lodówce (w temperaturze 5–10 °C) przez trzy miesiące.

▼M7

Dodatek 3

UTRZYMANIE KULTURY WYJŚCIOWEJ

W niniejszym dodatku 3 opisano kulturę wyjściową *Myriophyllum spicatum* L ([1]), zanurzonej w wodzie rośliny dwuliściennej, gatunku z rodziny wodnikowatych. W okresie od czerwca do sierpnia niepozorne różowobiałe kwiaty wystają ponad powierzchnię wody. Rośliny są zakorzenione w gruncie przez system solidnych kłączy i można je znaleźć na całej półkuli północnej w eutroficznych, jednak niezanieczyszczonych i zawierających większe ilości wapnia wodach stojących na podłożu mulistym. *Myriophyllum spicatum* preferuje wodę słodką, ale występuje również w wodach słonych.

W przypadku kultury wyjściowej w układzie pozbawionym osadu w warunkach laboratoryjnych wymagane jest stosowanie sterylnych roślin. Sterylne rośliny są udostępniane przez laboratorium ekotoksykologiczne niemieckiego Umweltbundesamt (Niemiecka Federalna Agencja Ochrony Środowiska).

Alternatywnie organizmy doświadczalne można przygotować z niesterylnych roślin zgodnie z normą ASTM E 1913-04. Zob. poniżej – ze standardowego przewodnika ASTM – procedura uprawy *Myriophyllum sibiricum* zebranego z terenu:

„W przypadku zbierania niesterylnych roślin w terenie należy zbierać pąki *M. sibiricum* jesienią. Następnie należy umieścić pąki w 20-litrowym akwarium wypełnionym 5-centymetrową warstwą sterylnego osadu, który pokryty jest piaskiem krzemionkowym lub np. substancją Turface® i 18 l wody odczynnikowej. Należy wietrzyć akwarium i utrzymywać w nim temperaturę 15 °C, zaś gęstość strumienia cząstek powinna wynosić od 200 do 300 μmol m^{-2} s^{-1} przez 16 godzin dziennie. Kultura roślinna w akwarium może być utrzymywana jako zapasowe źródło roślin w przypadku zniszczenia sterylnych kultur roślinnych przez awarię mechaniczną w komorze wzrostu, zanieczyszczenia lub z innych powodów. Rośliny trzymane w akwarium nie są sterylne, a sterylnych kultur nie można utrzymywać w systemie hodowli podzielonym na partie. Aby wysterylizować daną kulturę, rośliny usuwa się z akwarium, a następnie przepłukuje pod bieżącą wodą dejonizowaną przez około pół godziny. W aseptycznych warunkach panujących w komorze z nawiewem laminarnym rośliny dezynfekuje się nie dłużej niż 20 minut (do czasu, aż większa część tkanki rośliny będzie biała, a tylko wierzchołek rośliny pozostanie zielony) w 3-procentowym roztworze podchlorynu sodu (w/v) zawierającego 0,01-procentowym roztwór odpowiedniego środka powierzchniowo czynnego. Następnie należy wymieszać środek dezynfekujący i materiał roślinny. Segmenty z kilkoma węzłami przenosi się do sterylnych próbówek hodowlanych zawierających 45 ml sterylnej zmodyfikowanej pożywki Andrewsa i zamyka zwykłym zamknięciem próbówki. W każdej komorze badawczej umieszcza się tylko jeden segment rośliny. Do zabezpieczenia zamknięcia naczynia do hodowli stosuje się laboratoryjną masę uszczelniającą. Po utworzeniu sterylnej uprawy segmenty roślin posiadające kilka węzłów należy co 10–12 dni przenosić do nowych komór badawczych wypełnionych świeżą płynną pożywką zawierającą składniki odżywcze. Jak wykazano podczas uprawy na płytkach agarowych rośliny muszą być sterylne i pozostać takie przez osiem tygodni do czasu rozpoczęcia badania”.

Ze względu na fakt, że zmodyfikowana pożywka Andrewsa zawiera sacharozę (która stymuluje wzrost grzybów i bakterii), wszystkie materiały, roztwory i kultury przygotowuje się w sterylnych warunkach. Przed użyciem sterylizuje się wszystkie ciecze i sprzęt. Sterylizację przeprowadza się poprzez obróbkę ogrzanym powietrzem (210 °C) trwającą cztery godziny lub obróbkę w autoklawie trwającą 20 minut w temperaturze 121 °C. Ponadto wszystkie kolby, naczynia, miski itd. oraz inny sprzęt poddaje się opalaniu na sterylnym stole roboczym tuż przed użyciem.

Kultury wyjściowe można utrzymywać w środowisku o zmniejszonym oświetleniu i temperaturze (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) przez dłuższy okres, bez konieczności odtwarzania. Pożywka dla gatunku *Myriophyllum* powinna być taka sama jak używana do badań, lecz do kultur wyjściowych można używać innych pożywek bogatych w składniki odżywcze.

([1]) Carl von Linné (* 23 maja 1707 w Råshult /Älmhult; † 10 stycznia 1778 w Uppsali).

▼M7

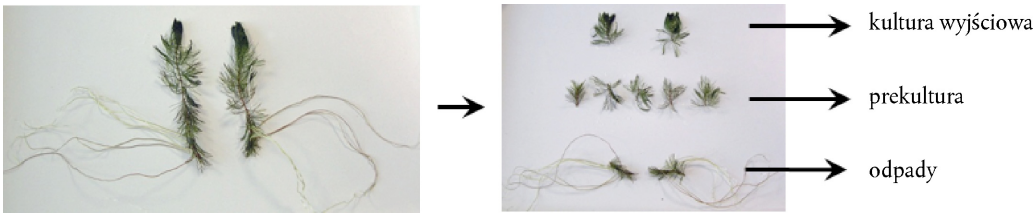
Segmenty roślin rozmieszcza się niezależnie w kilku kolbach typu Erlenmeyer o pojemności 500 ml lub Fernbach o pojemności 2 000 ml, przy czym każda wypełniona jest zmodyfikowaną pożywką Andrewsa w ilości odpowiednio 450 i 1 000 ml. Następnie kolby są niezależnie zamykane zatyczkami z celulozy.

Ponadto absolutnie konieczne jest dokładne opalanie sprzętu na sterylnym stole roboczym tuż przed użyciem. W zależności od liczby i wielkości rośliny przenosi się do świeżej substancji biogennej mniej więcej co trzy tygodnie.

Można wykorzystać wierzchołki oraz segmenty środkowej części łodygi w odniesieniu do tej odnowionej kultury. Liczba i wielkość przenoszonych roślin (lub segmentów roślin) jest uzależniona od liczby potrzebnych roślin. Na przykład można przenieść pięć segmentów pędu do kolby typu Fernbach i trzy do kolby typu Erlenmeyer, każdy o długości 5 cm. należy odrzucić wszelkie ukorzenione, kwitnące, martwe lub w inny sposób widoczne części.

Wykres 1

Przycinanie roślin na potrzeby kultury wyjściowej i prekultury po trzech tygodniach hodowli.



Uprawa roślin odbywa się w kolbach typu Erlenmeyer o pojemności 500 ml i kolbach typu Fernbach o pojemności 2 000 ml trzymanych w inkubatorze chłodzącym w temperaturze 20 ± 2 °C z ciągłym oświetleniem o natężeniu około 100–150 µE m^{-2} s^{-1} lub 6 000–9 000 luksów (emitowanym przez komorę oświetleniową z temperaturą barwową „ciepłe białe światło”).

Wykres 2

Uprawa roślin w inkubatorze chłodzącym z komorą oświetleniową.



Należy używać chemicznie czystych (przepłukanych kwasem) i sterylnych naczyń do hodowli komórkowych oraz stosować techniki aseptyczne. W przypadku zanieczyszczenia kultury wyjściowej, np. glonami, grzybami lub bakteriami, należy przygotować nową kulturę lub skorzystać z kultury wyjściowej z innego laboratorium w celu wymiany takiej kultury.

▼M7

Dodatek 4

UTRZYMANIE PREKULTURY I PRZYGOTOWANIE ORGANIZMU DOŚWIADCZALNEGO DO BADANIA

Aby uzyskać prekulturę należy pociąć pędy kultury wyjściowej na segmenty składające się z dwóch okółków każdy; następnie należy je umieścić w kolbach typu Fernbach wypełnionych zmodyfikowaną pożywką Andrewsa (z 3-procentowym roztworem sacharozy). Każda kolba może zawierać maksymalnie 50 segmentów pędów. Należy jednak zwrócić uwagę, że segmenty są żywe i nie posiadają żadnych korzeni ani gałęzi bocznych lub wyrastających z nich pąków (zob. rys. 1 w dodatku 3).

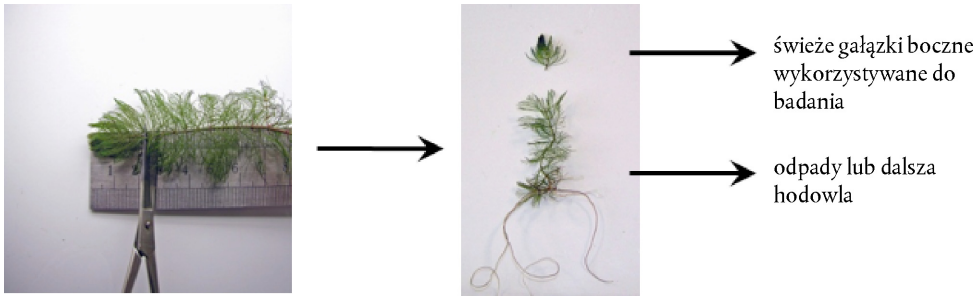
Organizmy prekultury są hodowane przez 14–21 dni w warunkach sterylnych w komorze klimatycznej ze zmieniającymi się fazami dnia/nocy trwającymi 16/8 godzin. Zakres wybranej światłości wynosi od 100–150 μE $m^{-2}s^{-1}$. Temperatura w naczyniach badawczych powinna wynosić 23 ±2 °C.

Ze względu na fakt, że zmodyfikowana pożywka Andrewsa zawiera sacharozę (która stymuluje wzrost glonów, grzybów i bakterii), roztwory badanej substancji chemicznej przygotowuje się w sterylnych warunkach i wykorzystuje do hodowli komórkowych. Przed użyciem sterylizuje się wszystkie ciecze i sprzęt. Sterylizację przeprowadza się poprzez obróbkę ogrzanym powietrzem (210 °C) trwającą cztery godziny lub obróbkę w autoklawie trwającą 20 minut w temperaturze 121 °C. Ponadto wszystkie kolby, naczynia, miski itd. oraz inny sprzęt poddaje się opalaniu na sterylnym stole roboczym tuż przed użyciem.

Pędy usuwa się niezależnie z kolb stosowanych do prekultury, wybierając materiał w jak największym stopniu jednorodny. Każde badanie wymaga co najmniej 60 organizmów doświadczalnych (badanie z wykorzystaniem ośmiu stężeń badanej substancji chemicznej). Do badania należy stosować świeże gałązki boczne z prekultury, skrócić je do długości 2,5 cm od podstawy (mierzone za pomocą linijki) i przenieść do zlewki zawierającej sterylną zmodyfikowaną pożywkę Andrewsa. Te świeże gałązki boczne można wykorzystać do badania toksyczności na *Myriophyllum spicatum* w układzie pozbawionym osadu.

Wykres 2

Przycinanie roślin z prekultury do badania toksyczności na *Myriophyllum spicatum* w układzie pozbawionym osadu



▼M7

C.51 BADANIE TOKSYCZNOŚCI NA *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* W UKŁADZIE WODA-OSAD

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 239 (2014). Dostępne są metody badawcze w odniesieniu do pływających jednoliściennych roślin wodnych z gatunku *Lemna* (1) i glonów (2). Metody te rutynowo stosuje się do generowania danych w celu ograniczenia ryzyka związanego z badanymi substancjami chemicznymi, w szczególności substancjami chemicznymi o działaniu chwastobójczym, na jakie narażone są wodne gatunki roślin niebędące przedmiotem badania. W niektórych przypadkach mogą być jednak wymagane dane dotyczące dodatkowych gatunków makrofitów. W najnowszych wytycznych opublikowanych w wyniku warsztatów prowadzonych przez Towarzystwo Toksykologii i Chemii Środowiskowej (SETAC) na temat oceny ryzyka wynikającego ze stosowania pestycydów na morskie makrofity stwierdzono, że dane dotyczące ukorzenionych gatunków makrofitów mogą być wymagane w odniesieniu do badanych substancji chemicznych, w przypadku gdy wiadomo, że gatunki *Lemna* i glonów nie są wrażliwe na tryb działania lub jeżeli oddzielenie od osadu stanowi problem i prowadzi do narażenia w wyniku pobierania przez korzenie (3). W oparciu o obecny stan wiedzy i doświadczenia za preferowane gatunki uznano gatunki *Myriophyllum* w przypadkach, gdy wymagane są dane dotyczące zanurzonych, ukorzenionych gatunków dwuliściennych (4) (5) (6). Niniejsze badanie nie ma zastąpić innych badań toksyczności dla organizmów wodnych; powinno je raczej uzupełniać, tak aby możliwa była bardziej kompletna ocena zagrożeń i ryzyka, na jakie narażone są rośliny wodne. Metoda badania na *Myriophyllum spicatum* w układzie woda-osad uzupełnia badanie toksyczności na *Myriophyllum spicatum* w układzie pozbawionym osadu (7).

2. W niniejszym dokumencie opisano metodę badawczą, która umożliwia ocenę wpływu badanej substancji chemicznej na ukorzenione, gatunki wodne *Myriophyllum spicatum*, rosnącego w układzie woda-osad. Dana metoda badawcza opiera się częściowo na istniejących metodach (1) (2) (8) i uwzględnia najnowsze badania dotyczące oceny ryzyka związanego z roślinami wodnymi (3). Metoda stosowana w układzie woda-osad została zweryfikowana w ramach międzynarodowego badania międzylaboratoryjnego na gatunkach *Myriophyllum* uprawianych w warunkach statycznych, które były narażone na działanie badanej substancji chemicznej w wyniku podawania tej substancji przez kolumnę wodną (9). Układ badawczy można jednak łatwo dostosować, tak aby umożliwić narażenie poprzez wzbogacony osad lub narażenie podczas fazy wodnej w scenariuszu półstatycznym lub scenariuszu impuls-dawka, chociaż scenariusze te nie zostały formalnie poddane badaniu międzylaboratoryjnemu. Ponadto można stosować ogólną metodę w odniesieniu do innych ukorzenionych, zanurzonych i wschodzących gatunków, w tym innych gatunków *Myriophyllum* (np. *Myriophyllum aquaticum*) i *Glyceria maxima* (10). Modyfikacje warunków badania, planu i czasu trwania badania mogą być wymagane w przypadku alternatywnych gatunków. W szczególności potrzebne są dalsze prace, aby określić odpowiednie procedury stosowane wobec gatunku *Myriophyllum aquaticum*. Opcji tych nie przedstawiono szczegółowo w niniejszej metodzie badawczej, która opisuje standardowe podejście do narażenia gatunku *Myriophyllum spicatum* na działanie substancji w układzie statycznym podczas fazy wodnej.

3. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do substancji, w odniesieniu do których zweryfikowano niniejszą metodę badawczą (zob. szczegółowe informacje na temat sprawozdania z badania międzylaboratoryjnego (9)), lub do postaci użytkowych lub znanych mieszanin. Można przeprowadzić badanie na gatunku *Myriophyllum* w celu spełnienia wymogu dotyczącego danych Tier 1 wynikającego z potencjalnego oddzielenia badanej substancji chemicznej od osadu lub kwestii związanych z trybem działania/selektywnością. Podobnie wymagane może być przeprowadzenie w laboratorium badania na gatunku *Myriophyllum* w ramach strategii wyższego rzędu w celu rozwiązania problemów związanych z ryzykiem, na jakie narażone są rośliny wodne. Szczególny powód do przeprowadzenia badania posłuży do określenia drogi narażenia (np. przez wodę lub osad). Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej do badania mieszaniny na potrzeby celu regulacyjnego należy zastanowić się nad tym, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

▼M7

ZASADA BADANIA

4. Badanie zaplanowano w celu oceny oddziaływań substancji chemicznej na wzrost wegetatywny roślin z gatunku *Myriophyllum* uprawianych na standardowym podłożu (woda, osad i składniki odżywcze). W tym celu wierzchołki pędów zdrowych niekwitnących roślin umieszcza się w doniczce w standardowym, sztucznym osadzie, który wzbogaca się dodatkowymi składnikami odżywczymi w celu zapewnienia odpowiedniego wzrostu rośliny, a następnie przechowuje się w pożywce Smarta i Barko (dodatek 1). Po okresie ukorzeniania, aby umożliwić roślinom tworzenie korzeni, naraża się je na działanie szeregu badanych stężeń dodanych do słupa wody. Alternatywnie, narażenie poprzez osad może być stymulowane przez wzbogacanie sztucznego osadu badaną substancją chemiczną i przenoszenie roślin do tego wzbogaconego osadu. W obu przypadkach rośliny utrzymuje się następnie w kontrolowanych warunkach otoczenia przez okres 14 dni. Wpływ na wzrost określa się na podstawie ilościowych ocen długości pędu, mokrej i suchej masy oraz ilościowych obserwacji objawów, takich jak chloroza, nekroza lub deformacje wzrostu.

5. Aby określić ilościowo skutki związane z substancją chemiczną, wzrost w roztworach do badań porównuje się ze wzrostem w grupach kontrolnych i wyznacza się stężenie powodujące zahamowanie wzrostu o określone x % i wyraża się je jako EC_x; „x” może mieć dowolną wartość w zależności od wymogów regulacyjnych np. EC_{10} EC_{20} i EC_{50}. Należy zauważyć, że szacunkowe wartości EC_{10} i EC_{20} są wiarygodne i odpowiednie jedynie w badaniach, w których współczynniki zmienności w kontrolowanych roślinach spadają poniżej szacowanego poziomu tj. współczynniki zmienności powinny wynosić < 20 % od dokładnie oszacowanej wartości EC_{20}.

6. Należy określić zarówno średnią właściwą szybkość wzrostu (oszacowaną na podstawie ocen długości pędu, mokrej masy pędu i suchej masy pędu), jak i przyrost (oszacowany na podstawie zwiększenia długości pędu, mokrej masy pędu i suchej masy pędu) roślin poddawanych i niepoddawanych działaniu substancji chemicznej. Właściwą szybkość wzrostu (r) i przyrost (y) wykorzystuje się następnie do określenia odpowiednio E_rC_x (np. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) i E_yC_x (np. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

7. Jeżeli jest to wymagane, można statystycznie określić najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, (LOEC) oraz najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, (NOEC) na podstawie szacunków dotyczących średniej właściwej szybkości wzrostu i przyrostu.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

8. Należy dysponować metodą analityczną zapewniającą należytą czułość pozwalającą na oznaczenie ilościowe substancji chemicznych w pożywce użytej do badania.

9. Informacje na temat badanej substancji chemicznej, które mogą być przydatne w ustaleniu warunków badania obejmują wzór strukturalny, skład (w przypadku substancji wieloskładnikowych), UVCB, mieszaniny lub postaci użytkowe, czystość, rozpuszczalność w wodzie, stabilność w wodzie i świetle, stała dysocjacji w środowisku kwaśnym (pK_a), współczynnik podziału oktanol/woda (K_{ow}), o ile dostępna jest wartość K_d dla osadu, prężność par oraz biodegradowalność. Rozpuszczalność w wodzie i prężność par mogą posłużyć do obliczenia stałej Henry'ego, która wskaże, czy istnieje prawdopodobieństwo znaczących strat badanej substancji chemicznej w okresie badania. Jeżeli istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia strat, należy je określić ilościowo oraz udokumentować kolejne kroki podejmowane w celu kontroli takich strat. W przypadku gdy dane dotyczące rozpuszczalności i stabilności badanej substancji chemicznej są niepewne, zaleca się oceniać te właściwości w warunkach badania, tj. uwzględniając pożywkę, temperaturę i warunki oświetlenia, które mają być zastosowane w badaniu. *Uwaga*: w przypadku badania utlenionych herbicydów zależnych od światła wykorzystywane oświetlenie laboratoryjne powinno zawierać równoważną ilość światła ultrafioletowego występującego w naturalnym świetle słonecznym.

▼M7

10. W stosownych przypadkach należy zmierzyć i dostosować pH pożywki użytej do badań. Kontrola pH pożywki użytej do badań jest szczególnie ważna np. gdy bada się metale lub substancje chemiczne, które są hydrolitycznie nietrwałe. Dalsze wskazówki dotyczące badania substancji chemicznych o właściwościach fizykochemicznych utrudniających ich badanie podano w wytycznych OECD (11).

WAŻNOŚĆ BADANIA

11. Aby wyniki badania były ważne średnia całkowita długość pędów i średnia mokra masa pędów w grupie kontrolnej musi zostać co najmniej podwojona w fazie narażenia badania. Ponadto rośliny z grupy kontrolnej nie mogą wykazywać żadnych wizualnych objawów chlorozy i powinny być wyraźnie pozbawione zanieczyszczeń wywoływanych przez inne organizmy, takie jak glony lub warstwa bakteryjna na roślinach, na powierzchni osadu i w pożywce użytej do badań.

12. Średni współczynnik zmienności w odniesieniu do przyrostu opartego na pomiarach mokrej masy pędów (tj. od rozpoczęcia do zakończenia badania) w kulturach kontrolnych nie przekracza 35 % między kontrpróbami.

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

13. Należy okresowo poddawać badaniu substancję chemiczną odniesienia, taką jak 3,5-dichlorofenol stosowanych w badaniu międzylaboratoryjnym (9), w celu sprawdzenia działania procedury badawczej wraz z upływem czasu. Z danych dotyczących badania międzylaboratoryjnego wynika, że średnie wartości EC50 3,5-dichlorofenolu dla różnych zmiennych zależnych wynosiły od 4,7 do 6,1 mg/l (zob. sprawozdanie z badania międzylaboratoryjnego zawierające szczegółowe informacje na temat przewidywanych przedziałów ufności w odniesieniu do tych wartości). Wskazane jest badanie substancji chemicznej odniesienia co najmniej dwa razy do roku lub, w przypadku gdy badanie przeprowadza się rzadko, równolegle z ostatecznymi badaniami toksyczności. Wytyczne dotyczące oczekiwanych wartości EC50 3,5-dichlorofenolu przedstawiono w sprawozdaniu statystycznym dotyczącym międzynarodowego badania międzylaboratoryjnego (9).

OPIS METODY

Aparatura badawcza

14. Badanie należy przeprowadzać w kontrolowanych warunkach otoczenia tj. w komorze wzrostowej, pomieszczeniu wzrostowym lub laboratorium z regulowaną długością dnia, temperaturą i regulowanym oświetleniem (zob. sekcja „warunki badania”, pkt 56–58). Kultury wyjściowe należy utrzymywać poza naczyniami badawczymi.

15. Badanie należy prowadzić przy użyciu szklanych naczyń badawczych, takich jak akwaria lub zlewki. Powszechnie wykorzystuje się zlewki szklane o pojemności 2 l (około 24 cm wysokości i 11 cm średnicy). Inne (np. większe) naczynia mogą być jednak odpowiednie, pod warunkiem że woda ma wystarczającą głębokość, co pozwoliłoby na nieograniczony wzrost i utrzymanie roślin zanurzonych przez cały czas trwania badania.

16. Doniczki na rośliny wykonane z tworzywa sztucznego lub szkła (około 9 cm średnicy, 8 cm wysokości i 500 ml objętości) można wykorzystywać jako pojemniki do przesadzania roślin do osadu. Alternatywnie można korzystać ze szklanych zlewek, które są preferowane w niektórych przypadkach (np. badanie hydrofobowych substancji chemicznych lub substancji chemicznych o wysokim K_{ow}).

17. Wybierając wielkość doniczki/zlewki należy uwzględnić również wybór naczynia badawczego i preferowany plan badania (zob. poniżej). W przypadku korzystania z planu badania A (jeden pęd w każdej doniczce i trzy doniczki w każdym naczyniu) konieczne mogą być mniejsze doniczki lub większe naczynia. W przypadku korzystania z planu badania B (trzy pędy w każdej doniczce i jedna doniczka w każdym naczyniu) wyznaczony rozmiar doniczki i naczynia powinien być odpowiedni. We wszystkich przypadkach minimalna głębokość wody powinna wynosić 12 cm powyżej górnej warstwy osadu oraz należy zarejestrować stosunek powierzchni/objętości osadu do powierzchni/objętości wody.

▼M7

Organizm doświadczalny

18. Ogólne podejścia opisane w niniejszej metodzie badawczej można wykorzystać do zbadania szeregu wodnych gatunków roślin. Warunki przedstawione w niniejszej metodzie badawczej zostały jednak dostosowane do badania gatunku z rodziny wodnikowatych, *Myriophyllum spicatum*. Gatunek ten należy do roślin dwuliściennych z rodziny Haloragaceae.

19. *Myriophyllum spicatum* (wywłócznik kłosowy) to zanurzony w wodzie i ukorzeniony gatunek, który toleruje szeroki zakres warunków i występuje zarówno w wodach stojących, jak i płynących. *M. spicatum* to roślina wieloletnia, która obumiera z powrotem do korzeni na zimę. Rośliny zwykle kwitną i wysiewają nasiona swobodnie, chociaż wegetatywne rozmnażanie z pąków bocznych lub fragmentów łodyg, które odpadają naturalnie lub po naruszeniu, często jest podstawową metodą kolonizacji.

Hodowla organizmów doświadczalnych

20. Rośliny można pozyskać z naturalnych populacji lub od dostawców roślin wodnych. W obu przypadkach należy udokumentować źródło roślin i zweryfikować pochodzenie gatunku. Należy zwrócić szczególną uwagę na zapewnienie, aby podczas zbierania *Myriophyllum spicatum* na określonym terenie, zwłaszcza w regionach, na których może krzyżować się z innymi gatunkami *Myriophyllum*, zebrano odpowiednie gatunki roślin. W razie wątpliwości zaleca się używanie zweryfikowanych kultur laboratoryjnych ze znanych źródeł. Do niniejszego badania nie należy używać roślin, które zostały narażone na działanie jakichkolwiek zanieczyszczeń chemicznych lub zebrane na terenie, o którym wiadomo, że jest zanieczyszczony.

21. W regionach, w których roślina *M. spicatum* nie jest łatwo dostępna w miesiącach zimowych, konieczne może być długotrwałe utrzymywanie kultur wyjściowych w warunkach szklarniowych lub laboratoryjnych. Kultury wyjściowe należy utrzymywać w warunkach podobnych do warunków badania, chociaż natężenie promieniowania i temperaturę można ograniczyć w celu zmniejszenia częstotliwości prac w zakresie utrzymania kultur (np. gdy w danym okresie nie planuje się badania na *Myriophyllum*). Zaleca się korzystanie z większych akwariów i doniczek na rośliny, niż te używane w badaniu, w celu zapewnienia roślinom miejsca do rozmnażania. Skład osadu i podłoża wodnego powinien być taki sam, jak ten użyty do badania, chociaż można przyjąć alternatywne metody nawożenia za pomocą osadu (np. wykorzystanie handlowych środków nawozowych o powolnym uwalnianiu).

22. Rośliny mateczne powinny być wyraźnie pozbawione zanieczyszczeń wszelkimi innymi organizmami, w tym ślimakami, glonami nitkowatymi, grzybami i owadami np. jajami lub larwami ćmy z gatunku *Paraponyx stratiotata* oraz larwami lub dorosłymi osobnikami z gatunku ryjkowcowatych *Eubrychius velutus*. Aby usunąć widoczne zanieczyszczenie konieczne może być opłukanie materiału roślinnego świeżą wodą. Ponadto należy dołożyć starań, aby zminimalizować rozwój glonów jednokomórkowych i skażenia bakteryjnego, chociaż całkowite wysterylizowanie materiału roślinnego nie jest konieczne. Kultury wyjściowe należy monitorować i w razie potrzeby przenieść w celu uniknięcia rozwoju skażenia glonami i bakteriami. Jeżeli skażenie glonami lub bakteriami staje się problematyczne korzystne może być napowietrzanie kultur wyjściowych.

23. We wszystkich przypadkach rośliny są uprawiane/aklimatyzowane w warunkach, które są podobne, ale niekoniecznie identyczne, do tych stosowanych podczas badania przez pewien okres (tj > 2 tygodni) zanim zostaną użyte do badania.

24. Do badania nie należy używać kwitnących kultur wyjściowych, ponieważ szybkość wzrostu wegetatywnego zwykle spada podczas kwitnienia i po kwitnieniu.

▼M7

Osad

25. Do niniejszego badania zaleca się wykorzystanie następującego osadu preparowanego opartego na sztucznym osadzie stosowanym w rozdziale C.28 niniejszego załącznika (8). Osad przygotowuje się w sposób opisany w metodzie badawczej C.28, z wyjątkiem dodawania składników odżywczych, co opisano poniżej:

a) 4–5 % torfu (sucha masa zgodnie z 2 ± 0,5 % węgla organicznego) o wartości pH możliwie najbardziej zbliżonej do przedziału 5,5 do 6,0; ważne jest, by stosować torf w postaci sproszkowanej, drobno zmielony (wielkość cząstek < 1 mm) i suszony wyłącznie powietrzem;

b) 20 % glinki kaolinowej (w przeliczeniu na suchą masę) (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);

c) 75–76 % piasku kwarcowego (w przeliczeniu na suchą masę) (powinien przeważać drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek mierzy od 50 do 200 μm);

d) wodną pożywkę dodaje się w takiej ilości, aby ostateczna partia osadu zawierała 200 mg/Kg suchego osadu zarówno chlorku amonu, jak i fosforanu sodu, a zawartość wilgoci w końcowej mieszaninie wynosiła od 30 do 50 %;

e) w celu skorygowania pH końcowej mieszaniny osadu do wartości 7,0 ± 0,5 dodaje się do niej chemicznie czysty węglan wapnia ($CaCO_3$).

26. Źródło torfu, glinki kaolinowej i piasku powinno być znane i udokumentowane. Jeżeli pochodzenie jest nieznane lub wywołuje pewne obawy, wówczas poszczególne składniki osadu należy sprawdzić pod kątem zanieczyszczenia chemicznego (np. metalami ciężkimi, związkami chloroorganicznymi, związkami fosforoorganicznymi).

27. Suche składniki osadu należy jednolicie wymieszać przed dokładnym wymieszaniem wodnej substancji biogennej z osadem. Wilgotny osad należy przygotować co najmniej dwa dni przed użyciem w celu zapewnienia dokładnego namoczenia torfu i uniemożliwienia wypływania na powierzchnię hydrofobowych cząstek torfu, po przykryciu osadu podłożem; przed użyciem wilgotny osad można przechowywać w miejscu bez dostępu światła.

28. Na potrzeby badania osad przenosi się do pojemników o odpowiedniej wielkości, takich jak doniczki na rośliny, które pasują do szklanych naczyń (powierzchnia osadu powinna zajmować około 70 % lub więcej powierzchni naczynia). W przypadkach, gdy dno pojemnika posiada otwory, kawałek bibuły filtracyjnej na dnie pomoże utrzymać osad w pojemniku. Doniczki wypełnia się osadem tak, aby powierzchnia osadu była równa, następnie pokrywa się ją cienką warstwą (~ 2–3 mm) obojętnego materiału np. piasku, drobnego żwiru ogrodniczego (lub pokruszonych koralowców) w celu utrzymania osadu na miejscu.

Pożywka użyta do badania

29. Do uprawy i badania *Myriophyllum spicatum* zaleca się stosowanie pożywki Smarta i Barko (12). Sposób przygotowania tej pożywki opisano w dodatku 1. Aby uzyskać optymalny wzrost rośliny, pH pożywki (faza wodna) po rozpoczęciu badania powinno wynosić od 7,5 do 8,0.

Układ doświadczalny

30. Do badania należy użyć co najmniej sześciu naczyń badawczych z kontrpróbą w odniesieniu do próby kontrolnej niepoddawanej działaniu substancji i minimum czterech naczyń badawczych z kontrpróbą w odniesieniu do każdego z co najmniej pięciu poziomów stężeń.

31. Jeżeli wyznaczenie NOEC nie jest wymagane, plan badania można zmienić, zwiększając liczbę stężeń i zmniejszając liczbę kontrprób przypadających na stężenie.

▼M7

32. Każde naczynie badawcze odpowiada jednej kontrpróbie zawierającej trzy pędy. Istnieją dwie możliwości uprawy trzech pędów w każdym naczyniu badawczym:

— plan badania A: jeden pęd w każdej doniczce i trzy doniczki w każdym naczyniu.

— plan badania B: trzy pędy w każdej doniczce i jedna doniczka w każdym naczyniu.

— Alternatywne plany badania obejmujące jeden pęd w każdej doniczce umieszczonej w naczyniu badawczym są dopuszczalne, pod warunkiem że replikacja jest należycie dostosowana w celu spełnienia wymaganych kryteriów ważności.

33. Należy losowo przydzielić poszczególne naczynia badawcze do grup badanych. Wymagany jest losowy plan umieszczania naczyń badawczych w obszarze badania, aby ograniczyć do minimum wpływ przestrzennych różnic światłości lub temperatury.

Stężenia badanej substancji chemicznej i grupy kontrolne

34. Stężenia powinny zazwyczaj być ułożone w serii geometrycznej; badane stężenia nie powinny się różnić o wielokrotność większą niż 3,2. W doborze odpowiednich badanych stężeń pomocna będzie uprzednia znajomość toksyczności badanej substancji chemicznej z badania ustalającego zakres.

35. Aby określić EC_x, badane stężenia powinny obejmować swoim zakresem wartość EC_x w celu zapewnienia odpowiedniego poziomu ufności. Na przykład jeżeli oszacowuje się EC_{50}, to najwyższe badane stężenie powinno być większe od wartości EC_{50}. Jeżeli wartość EC_{50} leży poza zakresem badanych stężeń, to związane z tym przedziały ufności będą większe, a odpowiednia ocena statystycznego dopasowania modelu może nie być możliwa. Wykorzystanie większej ilości badanych stężeń poprawi przedziały ufności wokół otrzymanej wartości EC_x.

36. Aby określić LOEC/NOEC (opcjonalny punkt końcowy) najniższe badane stężenie powinno być wystarczająco niskie, aby wzrost nie różnił się znacząco od wzrostu roślin w grupie kontrolnej. Ponadto najwyższe badane stężenie powinno być dostatecznie wysokie, aby wzrost był znacząco mniejszy niż w grupie kontrolnej. Wykorzystanie większej liczby kontrprób zwiększy moc statystyczną planu ze stężeniem niewywołującym żadnych zmian / planu ANOVA.

Badanie graniczne

37. W przypadkach, gdy z badania ustalającego zakres wynika, że badana substancja chemiczna nie wywołuje działań niepożądanych w stężeniach do 100 mg/l lub do jej rozpuszczalności granicznej w pożywce użytej do badania, lub – w przypadku postaci użytkowej – do jej dyspergowalności granicznej, można przeprowadzić badanie graniczne ułatwiające porównanie reakcji w grupie kontrolnej i jednej grupie badanej – przy stężeniu 100 mg/l lub równym granicznej rozpuszczalności, lub równym suchemu osadowi w ilości 1 000 mg/kg. Niniejsze badanie należy prowadzić zgodnie ogólnymi zasadami standardowego badania dawka-odpowiedź, z tym że zaleca się zwiększenie minimalnej liczby kontrprób do sześciu naczyń badawczych na kontrolę i stężenie. Wzrost w grupie kontrolnej i grupie badanej można poddać analizie przy użyciu testu statystycznego do porównywania średnich, np. testu t-Studenta.

Roztwory do badań

38. Roztwory do badań przygotowuje się zazwyczaj przez rozcieńczenie roztworu podstawowego, przygotowywanego przez rozpuszczenie lub rozproszenie badanej substancji chemicznej w pożywce Smarta i Barko, przy użyciu wody demineralizowanej (tj. destylowanej lub dejonizowanej) (zob. dodatek 1).

▼M7

39. Najwyższe badane stężenie zwykle nie powinno przekraczać rozpuszczalności badanej substancji chemicznej w wodzie lub, w przypadku postaci użytkowych, dyspergowalności w warunkach badania.

40. W przypadku badanych substancji chemicznych o słabej rozpuszczalności w wodzie może być konieczne przygotowanie stężonego roztworu podstawowego lub rozproszenie substancji chemicznej przy użyciu rozpuszczalnika organicznego lub środka dyspergującego, aby ułatwić dodanie precyzyjnych ilości badanej substancji chemicznej do pożywki użytej do badania oraz jej rozproszenie i rozpuszczenie. Należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć wykorzystania takich rozpuszczalników lub środków dyspergujących. Użycie pomocniczych rozpuszczalników lub środków dyspergujących nie powinno powodować fitotoksyczności. Na przykład do powszechnie używanych rozpuszczalników, które nie powodują fitotoksyczności w stężeniach do 100 µl/l, należą aceton i dimetyloformamid. W przypadku użycia rozpuszczalnika lub środka dyspergującego w sprawozdaniu należy podać jego stężenie końcowe i utrzymać je na minimalnym poziomie (≤ 100 µl/l). W tych okolicznościach we wszystkich grupach badanych i grupach kontrolnych (kontrola z rozpuszczalnikiem) należy zachować takie samo stężenie rozpuszczalnika lub środka dyspergującego. Kontrpróby stanowiące próbę kontrolną niepoddawaną działaniu substancji, które nie zawierają rozpuszczalnika ani środka dyspergującego, także są włączone do planu badania. Dalsze wskazówki na temat wykorzystania środków dyspergujących podano w wytycznych OECD (11).

PROCEDURA BADAWCZA

41. Procedura badawcza różni się w zależności od sposobu podawania badanej substancji chemicznej (tj. podczas fazy wodnej lub osadowej). Należy uwzględnić prawdopodobne zachowanie badanej substancji chemicznej w układzie woda-osad w celu poinformowania o wybranym schemacie narażenia stosowanym w ramach badania (tj. statycznym lub wymiany statycznej, wzbogaconej wodzie lub wzbogaconym osadzie). W niektórych przypadkach korzystniejsze może być prowadzenie badań wzbogaconego osadu w odniesieniu do substancji chemicznych, w przypadku których przewiduje się znaczące oddzielenie od osadu.

Faza ukorzeniania

42. Zdrowe wierzchołki/końcówki pędów tj. bez bocznych pędów odcina się od kultury rośliny w celu uzyskania długości pędu wynoszącej 6 cm (± 1 cm). W planie badania A (jeden pęd w każdej doniczce i trzy doniczki w każdym naczyniu) w każdej doniczce umieszcza się pojedynczą końcówkę pędu. W planie badania B (trzy pędy w każdej doniczce i jedna doniczka w każdym naczyniu) w każdej doniczce wypełnionej osadem umieszcza się od czterech do pięciu wierzchołków pędu.

43. W obu przypadkach należy obsadzić większą liczbę doniczek w celu umożliwienia selekcji jednolitych roślin na etapie rozpoczęcia badania oraz w celu zapewnienia zapasowych roślin wykorzystywanych do inspekcji wzrostu korzeni bezpośrednio przed podaniem substancji chemicznej oraz zapasowych roślin, które będą zbierane na potrzeby przeprowadzenia pomiarów biomasy i długości pędów w dniu 0.

44. Pędy umieszcza się tak, aby około 3 cm rośliny, zakrywając co najmniej dwa węzły, znajdowały się pod powierzchnią osadu.

45. Następnie doniczki przenosi się do naczyń badawczych trzymanych w tych samych warunkach otoczenia, co warunki fazy narażenia, i przetrzymuje przez 7 dni w pożywce Smarta i Barko w celu wywołania wzrostu korzeni.

46. Po tym czasie należy usunąć kilka roślin znajdujących się w dodatkowych doniczkach w celu zbadania wzrostu korzeni. Jeżeli wzrost korzenia nie jest widoczny (tj. końcówki korzenia nie są widoczne), należy wydłużyć fazę ukorzeniania do czasu, gdy wzrost korzenia będzie widoczny. Zaleca się przeprowadzenie tego etapu w celu zapewnienia aktywnego wzrostu roślin w chwili rozpoczęcia badania.

▼M7

Wybór jednolitego materiału roślinnego

47. W planie badania A (jeden pęd w każdej doniczce i trzy doniczki w każdym naczyniu) przed rozpoczęciem badania dokonuje się wyboru roślin w doniczkach pod kątem jednorodności. W planie badania B (trzy pędy w każdej doniczce i jedna doniczka w każdym naczyniu), rośliny stanowiące nadwyżkę usuwa się i zostawia się trzy rośliny o jednolitym rozmiarze i wyglądzie.

Narażenie na działanie substancji podczas fazy wodnej

48. Rośliny w doniczkach, które wybrano z powodu ich jednorodności, umieszcza się w naczyniach badawczych zgodnie z wymogami układu doświadczalnego. Następnie do naczynia badawczego dodaje się pożywkę Smarta i Barko. Należy dołożyć starań, aby uniknąć wzburzenia osadu. W tym celu można dodać pożywkę przy wykorzystaniu lejka lub dysku wykonanego z tworzywa sztucznego służącego do przykrycia osadu podczas wlewania pożywki do naczyń badawczych, pod warunkiem że dysk zostanie od razu usunięty. Ewentualnie doniczki z roślinami można umieścić w naczyniach badawczych po dodaniu pożywki. W obu przypadkach na początku fazy narażenia można korzystać ze świeżych pożywek, jeżeli jest to niezbędne do zminimalizowania potencjalnego nagromadzenia glonów i bakterii lub do umożliwienia przygotowania pojedynczych partii roztworu do badań we wszystkich kontrpróbach.

49. Długość pędu wystającą poza osad mierzy się przed dodaniem pożywki lub albo po jej dodaniu.

50. Przed wprowadzeniem pożywki użytej do badań do naczyń badawczych do pożywki można dodać odpowiednią ilość badanej substancji chemicznej. Ewentualnie badaną substancję chemiczną można wprowadzić do pożywki po wprowadzeniu jej do naczyń badawczych. Należy dopilnować, aby badana substancja chemiczna została równomierne rozprowadzona w całym układzie badawczym bez wzburzenia osadu.

51. We wszystkich przypadkach na początku badania odnotowuje się wygląd pożywek użytych do badań (np. czy są przejrzyste, mętne itd.).

Narażenie na działanie substancji poprzez osad

52. Wzbogacone osady wybranego stężenia przygotowuje się poprzez dodanie roztworu badanej substancji chemicznej bezpośrednio do świeżego osadu. Roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w wodzie dejonizowanej miesza się z osadem preparowanym przy użyciu walcarki, mieszalnika pasz lub ręcznie. Jeżeli badana substancja chemiczna słabo rozpuszcza się w wodzie, można ją rozpuścić w jak najmniejszej objętości odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego (np. heksanu, acetonu lub chloroformu). Roztwór taki następnie miesza się z drobnym piaskiem kwarcowym w ilości około 10 gramów na jedno naczynie badawcze. Należy pozwolić, by rozpuszczalnik wyparował, a następnie zmieszać piasek z ilością osadu odpowiednią dla każdej zlewki użytej w badaniu. Do rozpuszczania, rozpraszania lub emulgacji badanej substancji chemicznej można używać jedynie łatwo ulatniających się czynników. Należy pamiętać o tym, że należy uwzględnić objętość/masę piasku wzbogaconego o badaną substancję chemiczną w gotowym preparacie osadu (tj. osad należy zatem przygotować z mniejszej ilości piasku). Należy dopilnować, aby badana substancja chemiczna dodana do osadu została dokładnie i równomiernie rozprowadzona w osadzie.

53. Doniczki napełnia się wzbogaconym osadem (jak opisano powyżej). Rośliny, które wybrano ze względu na ich jednorodność oraz odpowiedni system korzeniowy, wyjmuje się z doniczek wykorzystywanych w fazie ukorzeniania i przenosi się je do wzbogaconego osadu, jak opisano powyżej.

54. Doniczki umieszcza się w naczyniach badawczych zgodnie z wymogami układu doświadczalnego. Następnie ostrożnie dodaje się pożywkę Smarta i Barko (tj. z użyciem lejka) w celu uniknięcia wzburzenia osadu. Długość pędu wystającą ponad osad mierzy się przed dodaniem pożywki albo po jej dodaniu.

▼M7

Utrzymanie poziomu wody w czasie trwania badania

55. Należy odnotować końcową objętość wody i zaznaczyć poziom wody na każdym naczyniu badawczym. Jeżeli w czasie trwania badania wyparuje więcej niż 10 % wody, poziom wody należy dostosować przy użyciu wody destylowanej. W razie potrzeby zlewki można luźno przykryć przezroczystym wieczkiem, takim jak przezroczyste pokrywy z tworzywa sztucznego, aby zminimalizować parowanie i zanieczyszczenie zarodnikami glonów.

Warunki badania

56. Oświetlenie w postaci ciepłego lub chłodnego białego światła fluorescencyjnego jest używane do zapewnienia natężenia promieniowania z zakresu około 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$, mierzonego jako promieniowanie fotosyntetycznie czynne (400–700 nm) na powierzchni wody i przy zastosowaniu rytmu dzień/noc w stosunku 16:8 godzin. Jakiekolwiek odstępstwa od wybranego natężenia promieniowania nie powinny przekraczać ± 15 %.

57. Temperatura w naczyniach badawczych wynosi 20 ± 2 °C.

58. Wartość pH pożywki kontrolnej nie powinna wzrosnąć w trakcie badania o więcej niż 1,5 jednostki. Odchylenie o więcej niż 1,5 jednostki nie spowoduje jednak unieważnienia badania, jeśli można wykazać, że spełniono określone wcześniej kryteria ważności.

Czas trwania badania

59. Okres narażenia wynosi 14 dni.

Pomiary i oznaczenia analityczne

60. Po zakończeniu fazy ukorzeniania i bezpośrednio przed poddaniem działaniu substancji chemicznej (tj. w dniu 0) zbiera się dodatkowe rośliny z pięciu losowo wybranych doniczek w układzie uwzględniającym trzy rośliny w jednej doniczce lub z 15 doniczek w układzie uwzględniającym jedną roślinę w jednej doniczce w celu oceny długości pędów oraz mokrej i suchej masy, jak opisano poniżej.

61. Rośliny przeniesione do fazy narażenia poddaje się następującym ocenom, które przedstawiono w tabeli 1:

— wyniki oceny długości pędu głównego, liczby pędów bocznych i długości pędów bocznych odnotowuje się przynajmniej pod koniec okresu narażenia (tj. w dniu 14);

— wyniki oceny wizualnej stanu zdrowia roślin odnotowuje się co najmniej trzy razy podczas okresu narażenia (tj. w dniach 0, 7 i 14);

— oceny mokrej masy i suchej masy pędów przeprowadza się pod koniec badania (tj. w dniu 14).

62. Długość pędów określa się przy użyciu linijki. Jeżeli obecne są pędy boczne, należy również dokonać pomiaru ich liczby i długości.

63. Oceny wizualne stanu zdrowia roślin przeprowadza się poprzez odnotowanie wyglądu roślin oraz ogólnego stanu pożywki użytej do badań. Należy zanotować następujące obserwacje:

— występowanie nekrozy, chlorozy lub innego odbarwienia, takiego jak nadmierne czerwienienie w porównaniu z roślinami kontrolnymi;

— rozwój zanieczyszczenia bakteriami lub glonami;

— występowanie anomalii wzrostu takich jak karłowatość, zmienionej odległości między węzłami, zniekształconych pędów/liści, proliferacji pędów bocznych, utraty liści, utraty turgoru i fragmentacji łodygi;

▼M7

— oceny wizualne stanu zdrowia korzenia przeprowadza się na zakończenie badania, ostrożnie wymywając osad z korzeni w celu umożliwienia obserwacji systemu korzeniowego. Poniżej przedstawiono proponowaną skalę oceny w stosunku do roślin kontrolnych:

1) brak korzeni

2) kilka korzeni

3) korzenie rozwinięte w stopniu umiarkowanym

4) bardzo dobrze rozwinięte korzenie, przypominające korzenie roślin z próby kontrolnej.

64. Oceny mokrej masy przeprowadza się na początku i na koniec badania, odcinając pęd na poziomie osadu, a następnie osuszając go przed ważeniem. Należy dopilnować, by usunąć cząsteczki osadu, które mogą przywierać do podstawy pędu. Następnie przed ponownym ważeniem i odnotowaniem suchej masy materiał składający się z pędów umieszcza się w piecu suszarniczym w temperaturze około 60 °C i suszy się do uzyskania stałej masy.

65. W tabeli 1 przedstawiono podsumowanie minimalnych ocen biologicznych, które należy przeprowadzić w czasie trwania badania.

Tabela 1

Harmonogram przeprowadzania ocen

Dzień po poddaniu działaniu substancji chemicznej (DAT)	*Myriophyllum spicatum*			
	Długość pędu, długość pędów bocznych i ich liczba	Ocena wizualna pędów	Mokra i sucha masa pędu Ocena wizualna korzeni	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: wskazuje, że w tych sytuacjach wymagane jest przeprowadzenie ocen
—: wskazuje brak potrzeby przeprowadzania pomiarów

Częstotliwość pomiarów i oznaczeń analitycznych

66. Temperaturę pożywki w naczyniu uzupełniającym przetrzymywanym w takich samych warunkach w komorze wzrostu, inkubatorze lub pomieszczeniu należy odnotowywać co najmniej codziennie (lub w sposób ciągły przy użyciu rejestratora).

67. Wartość pH pożywki użytej do badań i zawarte w niej stężenie rozpuszczonego tlenu należy sprawdzać na początku badania, co najmniej raz w trakcie badania i na koniec badania we wszystkich naczyniach z kontrpróbą. Pomiary należy przeprowadzać za każdym razem o tej samej porze dnia. Jeżeli do przygotowania wszystkich kontrprób zawierających każde badane stężenie wykorzystuje się roztwory o dużej objętości, dopuszczalne jest przeprowadzenie jednego pomiaru każdego roztworu o dużej objętości w dniu 0.

68. Natężenie promieniowania należy mierzyć w komorze wzrostu, inkubatorze lub pomieszczeniu w punktach odpowiadających poziomowi powierzchni wody. Pomiary należy przeprowadzać co najmniej raz na początku badania lub w ciągu badania. Metoda detekcji i pomiaru światła, w szczególności typ

▼M7

czujnika, będzie miała wpływ na wartość pomiarową. Nad czujniki jednokierunkowe przedkładane są czujniki sferyczne (które reagują na światło padające pod wszystkimi kątami powyżej i poniżej płaszczyzny pomiaru) oraz czujniki „kosinusowe" (które reagują na światło padające pod wszystkimi kątami powyżej płaszczyzny pomiaru) i dają wyższe odczyty w przypadku opisywanego tu typu wielopunktowego źródła światła.

Pomiary analityczne badanej substancji chemicznej

69. Prawidłowe stosowanie badanej substancji chemicznej należy potwierdzić wynikami pomiarów analitycznych stężeń badanej substancji chemicznej.

70. Próbki wody ze wszystkich badanych stężeń, które posłużą do przeprowadzenia analizy badanej substancji chemicznej, należy pobrać krótko po rozpoczęciu badania (tj. w dniu podania substancji w przypadku stabilnych badanych substancji chemicznych lub godzinę po podaniu substancji w przypadku niestabilnych substancji chemicznych) oraz na koniec badania.

71. Stężenia w osadzie i w osadowej wodzie porowej należy określić na początku i na końcu badania przynajmniej w próbie zawierającej najwyższe badane stężenie, chyba że wiadomo, iż badana substancja chemiczna jest stabilna w wodzie (> 80 % stężenia nominalnego). Przeprowadzenie pomiarów osadu i wody porowej może nie być konieczne, jeżeli podział badanej substancji chemicznej między wodą a osadem został wyraźnie określony w badaniu stosunku woda/osad przeprowadzonym w porównywanych warunkach (np. stosunek osadu do wody, metoda podania, rodzaj osadu).

72. Istnieje prawdopodobieństwo, że pobieranie próbek osadu na początku badania zaburzy stabilność układu badawczego. W związku z tym wymagane może być użycie dodatkowych naczyń badawczych zawierających badaną substancję chemiczną, które ułatwią wykonywanie oznaczeń analitycznych na początku i na końcu badania. Podobnie, jeżeli istnieje konieczność przeprowadzenia ocen pośrednich, tj. w dniu 7, a do przeprowadzenia analizy potrzebne są duże próbki osadu, których nie można w łatwy sposób pobrać z układu badawczego, należy przeprowadzić oznaczenia analityczne z wykorzystaniem dodatkowych naczyń badawczych, w których substancję chemiczną podano w taki sam sposób, jak w naczyniach wykorzystywanych do przeprowadzenia ocen biologicznych.

73. Aby oddzielić wodę porową, zaleca się odwirowanie np. przy 10 000 g w temp. 4°C przez 30 minut. Jeżeli jednak wykazano, że badana substancja chemiczna nie jest absorbowana przez filtry, dopuszczalna jest również filtracja. W niektórych przypadkach analiza stężeń w wodzie porowej może być niemożliwa ze względu na zbyt mały rozmiar próbki.

74. W badaniach półstatycznych (tj. w których narażenie na działanie substancji ma miejsce podczas fazy wodnej), w których nie oczekuje się, że stężenie danej badanej substancji chemicznej (danych badanych substancji chemicznych) utrzyma się w zakresie 20 % stężenia nominalnego w czasie trwania badania bez wymiany roztworów do badań, podczas każdej wymiany należy pobrać próbki wykorzystanych i świeżych roztworów do badań do celów analizy stężenia badanej substancji chemicznej.

75. W przypadkach, w których zmierzone stężenie początkowe badanej substancji chemicznej nie mieści się w granicach 20 % stężenia nominalnego, lecz można przedstawić wystarczające dowody wykazujące, że stężenia początkowe są powtarzalne i stabilne (tj. zawierają się w granicach 80–120 % stężenia początkowego), oznaczenia chemiczne można przeprowadzać tylko przy najwyższych i najniższych badanych stężeniach.

76. We wszystkich przypadkach oznaczenie stężeń badanej substancji chemicznej należy wykonywać wyłącznie na jednym naczyniu z kontrpróbą przy każdym badanym stężeniu. Ewentualnie na potrzeby analizy można połączyć roztwory do badań ze wszystkich kontrprób dla każdego stężenia.

77. Jeżeli istnieją dowody, że stężenie badanej substancji chemicznej zostało utrzymane w granicach 20 % nominalnego lub zmierzonego stężenia początkowego w ciągu całego badania, to analizę wyników i późniejsze wyprowadzenie punktów końcowych można oprzeć na nominalnych lub zmierzonych wartościach początkowych.

▼M7

78. W tych przypadkach stężenia efektywne należy oszacować w oparciu o nominalne lub zmierzone stężenia substancji w wodzie na początku badania.

79. Jeżeli jednak istnieją dowody wskazujące na to, że w czasie trwania badania stężenie zmniejszyło się (tj. nie utrzymuje się w granicach 20 % nominalnego lub zmierzonego stężenia początkowego w komorze, w której podano substancję chemiczną), to analiza wyników należy oprzeć na średniej geometrycznej stężenia podczas narażenia lub na modelach opisujących spadek stężenia badanej substancji chemicznej w komorze, w której podano substancję chemiczną (11).

OCENA DANYCH

80. W przypadkach, w których wymagane jest użycie rozpuszczalnika / środka dyspergującego, na potrzeby przeprowadzenia analiz statystycznych można połączyć ze sobą dane z prób kontrolnych poddawanych działaniu rozpuszczalnika i prób kontrolnych niepoddawanych działaniu substancji, pod warunkiem że różnice w reakcji prób poddanych i niepoddanych działaniu rozpuszczalnika nie są w statystycznie istotny sposób różne.

Zmienne zależne

81. Celem badania jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na wzrost wegetatywny gatunków doświadczalnych przy wykorzystaniu dwóch zmiennych zależnych, średniej właściwej szybkości wzrostu i przyrostu, w następujący sposób:

Średnia właściwa szybkość wzrostu

82. Wartość niniejszej zmiennej zależnej określa się na podstawie zmian logarytmów całkowitej długości pędów, całkowitej mokrej masy pędów i całkowitej suchej masy pędów w czasie w próbach kontrolnych i w każdej grupie badanej. Wspomnianą zmienną oblicza się dla każdej kontrpróby z każdej grupy kontrolnej i grupy badanej. Należy obliczyć średnią długość i masę trzech roślin dla każdego naczynia badawczego (z kontrpróbą), a następnie obliczyć szybkość wzrostu dla każdej kontrpróby, korzystając z następującego wzoru:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

gdzie:

μ_{i-j}: średnia właściwa szybkość wzrostu od czasu i do czasu j,

N_i: zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie i,

N_j: zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie j,

t: czas mierzony od i do j.

83. Z reakcji kontrprób należy wyliczyć średnią wartość szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji dla każdej grupy badanej i grupy kontrolnej.

84. Średnią właściwą szybkość wzrostu należy obliczyć dla całego okresu badania (czas „i” w powyższym równaniu jest początkiem badania, a czas „j” jest końcem badania). Dla każdego badanego stężenia i dla każdej grupy kontrolnej należy obliczyć średnią wartość średniej właściwej szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji.

▼M7

85. Następnie można obliczyć procentowe zahamowanie szybkości wzrostu (I_r) dla każdego badanego stężenia (grupy badanej) zgodnie z poniższym wzorem:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

gdzie:

% Ir: procentowe zahamowanie średniej właściwej szybkości wzrostu

μC: średnia wartość μin w próbie kontrolnej

μT: średnia wartość μin w grupa badanej

Przyrost

86. Wartość niniejszej zmiennej zależnej określa się na podstawie zmian całkowitej długości pędów, całkowitej mokrej masy pędów i całkowitej suchej masy pędów w czasie w próbach kontrolnych i w każdej grupie badanej. Średnią procentowe zahamowanie przyrostu (% Iy) można obliczyć dla każdej grupy badanej w następujący sposób:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

gdzie:

% I_y: procentowe zmniejszenie przyrostu

b_C: biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy kontrolnej

b_T: biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy badanej

Wykreślanie krzywych stężenie-odpowiedź

87. Należy wykreślić krzywe stężenie-odpowiedź wiążące średnie procentowe zahamowanie zmiennej zależnej (I_r lub I_y obliczone w sposób wskazany powyżej) i logarytm stężenia badanej substancji chemicznej.

Oszacowanie EC_x

88. Oszacowania EC_x (np. EC_{50}) powinny być oparte zarówno na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_rC_x), jak i na przyroście (E_yC_x), przy czym każdy z tych parametrów powinien być z kolei oparty na całkowitej mokrej masie pędu, całkowitej suchej masie pędu i całkowitej długości pędów.

89. Należy zauważyć, że wartości EC_x obliczone przy użyciu tych dwóch zmiennych zależnych nie są porównywalne i różnicę tę należy uwzględnić przy wykorzystywaniu wyników badania. Jeżeli spełnione są warunki badania określone w niniejszej metodzie badawczej, wartości EC_x oparte na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_rC_x) będą w większości przypadków wyższe od wyników opartych na przyroście (E_yC_x) ze względu na podstawę matematyczną tych podejść. Nie należy interpretować tego jako różnicy we wrażliwości pomiędzy tymi dwiema zmiennymi zależnymi, lecz jedynie jako stwierdzenie, że wartości te są różne pod względem matematycznym.

Procedury statystyczne

90. Celem jest uzyskanie ilościowej zależności stężenie-odpowiedź za pomocą analizy regresji. Możliwe jest zastosowanie ważonej regresji liniowej po przeprowadzeniu transformacji linearyzującej danych reakcji – na przykład do jednostek probit, logit albo Weibulla (13), lecz preferowane są procedury regresji nieliniowej, które lepiej sprawdzają się w przypadku nieuniknionych nieregularności danych i odchyleń od wyrównanych rozkładów. Przy zbliżaniu się do zerowego albo całkowitego zahamowania nieregularności takie

▼M7

mogą zostać powiększone przez transformację, zakłócając analizę (13). Należy zwrócić uwagę, że standardowe metody analizy przy użyciu transformat probit, logit albo Weibulla są przeznaczone do stosowania do danych binarnych (np. dotyczących upadkowości lub przeżywalności) i muszą zostać zmodyfikowane, aby uwzględnić dane dotyczące szybkości wzrostu lub przyrostu. Szczegółowe procedury wyznaczania wartości EC_x na podstawie ciągłych danych można znaleźć w (14) (15) (16) (17).

91. Dla każdej zmiennej zależnej, która ma być analizowana, należy zastosować zależność stężenie-odpowiedź do obliczenia oszacowań punktowych wartości EC_x. Określa się 95 % granice ufności dla każdej zmiennej, przy czym zgodność danych reakcji z modelem regresji należy ocenić graficznie lub statystycznie. Analizę regresji należy przeprowadzić z zastosowaniem reakcji z poszczególnych kontrprób, a nie średnich z grup badanych.

92. Oszacowania wartości EC_{50} i granice ufności można również otrzymać przy użyciu interpolacji liniowej z zastosowaniem metody bootstrap (18), jeżeli dostępne modele/metody regresji są nieodpowiednie do danych.

93. W celu oszacowania LOEC, a następnie NOEC konieczne jest porównanie średnich z grup badanych przy użyciu technik analizy wariancji (ANOVA). Średnią dla każdego stężenia następnie porównuje się ze średnią kontrolną przy użyciu odpowiedniej metody badawczej (np. testów Dunnetta, Williamsa) (19) (20) (21) (22). Należy ocenić, czy przyjęte w ANOVA założenie rozkładu normalnego (ND) i jednorodności wariancji (VH) pozostaje ważne. Ocenę tę należy przeprowadzić za pomocą testu Shapiro-Wilka (ND) lub testu Levene'a (VH). Niespełnienie założenia o ND i jednorodności wariancji można niekiedy skorygować za pomocą transformacji logarytmicznej danych. Jeżeli heterogeniczność wariancji lub odchylenie od ND są ekstremalne i nie można ich skorygować przez transformację, należy rozważyć analizę za pomocą takich metod, jak test t Welcha z korektą Bonferroniego, regresyjny test Jonckheere'a Terpstry i test Mediana z korektą Bonferroniego. Dodatkowe wskazówki dotyczące wyznaczania NOEC można znaleźć w (16).

SPRAWOZDAWCZOŚĆ

94. Szczegółowe informacje zawarte w sprawozdaniu z badania są następujące:

Badana substancja chemiczna

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Gatunek doświadczalny

— nazwa systematyczna i źródło.

Warunki badania

— czas trwania i warunki fazy ukorzeniania;

— zastosowana procedura badawcza (statyczna, półstatyczna lub z wykorzystaniem impulsów);

▼M7

— data rozpoczęcia badania i czas jego trwania;

— pożywka użyta do badań, tj. osad i płynna pożywka;

— opis układu doświadczalnego: komora wzrostowa / pomieszczenie wzrostowe lub laboratorium, naczynia badawcze i przykrywki, objętości roztworów, długość i masa roślin użytych do badania w każdym naczyniu badawczym na początku badania, stosunek powierzchni osadu do powierzchni wody, stosunek objętościowy osadu i wody;

— badane stężenia (nominalne i zmierzone, w stosownych przypadkach) oraz liczba kontrprób na stężenie;

— metody przygotowywania roztworów podstawowych i roztworów do badań, w tym zastosowanie ewentualnych rozpuszczalników lub środków dyspergujących;

— temperatura podczas badania;

— źródło światła, natężenie promieniowania ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$);

— wartości pH pożywki użytej do badań i pożywki kontrolnej oraz wygląd pożywki użytej do badań na początku i na końcu;

— stężenia tlenu;

— metoda analizy wraz z odpowiednimi danymi oceny jakości (badania walidacyjne, odchylenia standardowe lub granice ufności analiz);

— metody określania zmiennych pomiarowych, np. długości, suchej masy, mokrej masy;

— wszelkie odstępstwa od niniejszej metody badawczej.

Wyniki

— dane pierwotne: długość pędu i masa pędów roślin/doniczkę oraz inne zmienne pomiarowe w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym podczas każdej obserwacji i analizy zgodnie z harmonogramem oceny przedstawionym w tabeli 1;

— średnie i odchylenia standardowe dla każdej zmiennej pomiarowej;

— krzywe wzrostu dla każdego stężenia;

— czas podwojenia/szybkość wzrostu w próbie kontrolnej na podstawie długości pędu i mokrej masy z uwzględnieniem współczynnika zmienności dla przyrostu mokrej masy;

— obliczone zmienne zależne dla każdej kontrpróby poddanej działaniu substancji chemicznej wraz z wartościami średnimi i współczynnikiem zmienności dla kontrprób;

— graficzne przedstawienie zależności stężenie/skutek;

— oszacowania toksycznych punktów końcowych dla zmiennych zależnych, np. EC_{50}, oraz związane z nimi przedziały ufności. LOEC lub NOEC, jeżeli zostały obliczone, oraz metody statystyczne użyte do ich wyznaczenia;

— jeżeli zastosowano ANOVA – wielkość wpływu, który można wykryć (np. najmniejsza znacząca różnica);

— wszelka stymulacja wzrostu stwierdzona w którejkolwiek próbie poddanej działaniu substancji chemicznej;

▼M7

— wszelkie wizualne oznaki fitotoksyczności, jak również obserwacje roztworów do badań;

— omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

(1) Rozdział C.26 niniejszego załącznika: Badanie inhibicji wzrostu u Lemna sp.,.

(2) Rozdział C.3 niniejszego załącznika: Badanie zahamowania wzrostu słodkowodnych glonów i sinic

(3) Maltby, L. *et al.* (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14–16 stycznia 2008 r.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, t. 153, s. 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, t. 62/8, s. 715–722.

(7) Rozdział C.50 niniejszego załącznika: Badanie toksyczności na *Myriophyllum* spicatum w układzie pozbawionym osadu.

(8) Rozdział C.28 niniejszego załącznika: Badanie toksyczności w układzie osad-woda na ochotkowatych z wykorzystaniem wzbogaconej wody.

(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", Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 206, OECD Publishing, Paryż.

(10) Davies, J. *et al.* (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, t. 59/2, s. 231–237.

(11) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 23, OECD Publishing, Paryż.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, t. 21/3, s. 251–263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science and Technology, t. 18/9, s. 713–718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, t. 11/2, s. 157–167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, t. 11/10, 1485–1494.

(16) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 54, OECD Publishing, Paryż.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, t. 29/2, s. 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, t. 50/272, s. 1096–1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, t. 20/3, s. 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, t. 27/1, s. 103–117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, t. 28/2, s. 519–531.

▼**M7**

Dodatek 1

SKŁAD POŻYWKI SMARTA I BARKO

Składnik	Ilość odczynnika dodanego do wody (*) (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 (równowaga powietrza)	7,9

(*) woda demineralizowana (tj. destylowana lub dejonizowana)

▼M7

Dodatek 2

DEFINICJE

Biomasa oznacza mokrą lub suchą masę materii żywej obecnej w populacji. W niniejszym badaniu biomasa stanowi sumę mas pędu głównego, wszystkich gałązek bocznych i wszystkich korzeni.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Chloroza oznacza zmianę barwy organizmu doświadczalnego, w szczególności okółków, z zielonej na żółciejącą.

ECx oznacza stężenie badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w pożywce użytej do badań, powodujące ograniczenie wzrostu *Myriophyllum spicatum* o x % (np. o 50 %) w określonym okresie narażenia (który należy dokładnie określić, jeżeli odbiega od pełnego lub zwykłego czasu trwania badania). Aby jednoznacznie oznaczyć wartość EC wynikającą z szybkości wzrostu albo przyrostu, w odniesieniu do szybkości wzrostu używa się symbolu „E_rC”, a w odniesieniu do przyrostu – symbolu „E_yC”, po którym następuje użyta zmienna pomiarowa, np. E_rC (długość pędu głównego).

Wzrost oznacza wzrost wartości zmiennej pomiarowej, np. długości pędu głównego, całkowitej długości gałązek bocznych, całkowitej długości pędów, całkowitej długości korzenia, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków, w okresie badania.

Szybkość wzrostu (średnia właściwa szybkość wzrostu) oznacza logarytmiczny wzrost wartości zmiennej pomiarowej w okresie narażenia. *Uwaga*: zmienne zależne związane z szybkością wzrostu są niezależne od czasu trwania badania, o ile przebieg wzrostu organizmów kontrolnych nienarażonych na działanie substancji jest wykładniczy.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, (LOEC) oznacza najniższe badane stężenie, przy którym obserwuje się, że substancja chemiczna ma statystycznie istotny wpływ na ograniczenie wzrostu (przy $p < 0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną w danym czasie narażenia. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC powinny wywierać szkodliwy skutek równy skutkom lub większy niż skutki obserwowane przy LOEC. W przypadku gdy oba warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC).

Zmienne pomiarowe oznaczają dowolnego typu zmienne, które mierzy się, aby wyrazić punkt końcowy przy użyciu jednej zmiennej zależnej lub większej ich liczby. W niniejszej metodzie badawczej długość pędu głównego, całkowita długość gałązek bocznych; całkowita długość pędów, całkowita długość korzenia, mokra masa, sucha masa oraz liczba okółków stanowią zmienne pomiarowe.

Monokultura oznacza kulturę z jednym gatunkiem rośliny.

Nekroza oznacza martwą (tj. barwy białej lub ciemnobrązowej) tkankę organizmu doświadczalnego.

Najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, (NOEC) oznacza badane stężenie bezpośrednio poniżej LOEC.

Zmienna zależna oznacza zmienną służącą do szacowania toksyczności, uzyskaną z dowolnych zmierzonych zmiennych opisujących biomasę za pomocą różnych metod obliczania. W przypadku niniejszej metody badawczej szybkość wzrostu i przyrost są zmiennymi zależnymi wyprowadzonymi ze zmiennych pomiarowych, takich jak: długość pędu głównego, całkowita długość pędów, mokra masa, sucha masa czy liczba okółków.

Badanie półstatyczne (z wymianą) oznacza badanie, w którym roztwór do badań jest okresowo wymieniany w określonych odstępach czasu w trakcie badania.

▼M7

Badanie statyczne oznacza metodę badawczą bez wymiany roztworu do badań w trakcie badania.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Punkt końcowy badania opisuje ogólny czynnik, który będzie ulegał zmianie pod wpływem badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną, co jest celem badania. W niniejszej metodzie badawczej punktem końcowym badania jest zahamowanie wzrostu, które można wyrazić za pomocą różnych zmiennych zależnych opartych na jednej zmiennej pomiarowej lub większej ich liczbie.

Pożywka użyta do badań oznacza kompletną syntetyczną pożywkę, na której wzrastają rośliny wykorzystywane do badań, gdy są narażone na działanie badanej substancji chemicznej. Badana substancja chemiczna jest zwykle rozpuszczona w pożywce użytej do badania.

UVCB oznacza substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

Przyrost oznacza wartość zmiennej pomiarowej wyrażającą biomasę na końcu okresu narażenia pomniejszoną o wartość zmiennej pomiarowej na początku okresu narażenia. Uwaga: jeżeli przebieg wzrostu organizmów nienarażonych na działanie substancji jest wykładniczy, wartość zmiennych zależnych opartych na przyroście będzie ulegała zmniejszeniu wraz z upływem czasu trwania badania..

▼M8

C.52. ROZSZERZONE BADANIE ROZRODCZOŚCI JEDNEGO POKOLENIA RYŻANKI JAPOŃSKIEJ (MEOGRT)

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 240 (2015). Rozszerzone badanie jednego pokolenia ryżanki japońskiej (ang. *Medaka Extended One Generation Test, MEOGRT*) opisuje kompleksową metodę badawczą, która polega na poddawaniu ryb działaniu substancji chemicznych na przestrzeni kilku pokoleń celem uzyskania danych istotnych z punktu widzenia oceny zagrożenia ekologicznego oraz oceny ryzyka stwarzanego przez substancje chemiczne, w tym substancje chemiczne, co do których podejrzewa się, że mogą zaburzać funkcjonowanie układu hormonalnego (EDC). Narażenie w badaniu MEOGRT trwa do czasu wylęgu (który ma miejsce dwa tygodnie po zapłodnieniu) w drugim pokoleniu (F2). Aby uzasadnić przydatność przedłużenia pokolenia F2 poza fazę wylęgu, konieczne byłyby dodatkowe badania; w chwili obecnej nie ma wystarczających informacji, aby zapewnić odpowiednie warunki lub kryteria uzasadniające przedłużenie pokolenia F2. Niniejsza metoda badawcza może być jednak aktualizowana w miarę uwzględniania nowych informacji i danych. Na przykład wytyczne dotyczące przedłużenia pokolenia F2 poprzez rozmnażanie mogą być potencjalnie użyteczne w pewnych okolicznościach (np. w przypadku substancji chemicznych charakteryzujących się wysokim potencjałem biokoncentracji lub w odniesieniu do których istnieją wskazania dotyczące występowania skutków międzypokoleniowych w innych taksonach). Niniejszą metodę badawczą można stosować, aby ocenić potencjalny wpływ długoterminowy substancji chemicznych na ryby, w tym substancji chemicznych potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. W metodzie tej główny nacisk kładzie się na potencjalne skutki istotne dla populacji (takie jak niekorzystny wpływ na przeżywalność, rozwój, wzrost i rozrodczość), aby obliczyć najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, (NOEC) lub stężenie efektywne (EC_x), chociaż należy zauważyć, że metody obliczania EC_x rzadko są odpowiednie w przypadku dużych badań tego rodzaju, w których zwiększenie liczby badanych stężeń w celu umożliwienia określenia pożądanego EC_x może być niepraktyczne, co może również powodować poważne obawy związane z dobrostanem zwierząt ze względu na dużą liczbę wykorzystywanych zwierząt. W przypadku substancji chemicznych niewymagających oceny na przestrzeni wielu pokoleń lub substancji chemicznych, które nie są substancjami chemicznymi potencjalnie zaburzającymi funkcjonowanie układu hormonalnego, bardziej odpowiednie mogą być jednak inne metody badawcze (1). Ryżanka japońska jest odpowiednim gatunkiem do wykorzystania w niniejszej metodzie badawczej ze względu na jej krótki cykl życia i możliwość określenia jej płci genetycznej (2), co stanowi bardzo istotny element w niniejszej metodzie badawczej. Konkretne metody i punkty końcowe obserwacji wyszczególnione w niniejszej metodzie badawczej mają zastosowanie wyłącznie do ryżanki japońskiej. Inne gatunki małych ryb (jak np. danio pręgowany) można przystosować do podobnego protokołu badań.

2. Niniejsza metoda badawcza służy do pomiaru kilku biologicznych punktów końcowych. Główny nacisk kładzie się na potencjalny niekorzystny wpływ na parametry istotne dla populacji, w tym przeżywalność, rozwój makroskopowy, wzrost i rozrodczość. W następnej kolejności – w celu dostarczenia informacji mechanistycznych oraz przedstawienia powiązania między wynikami innych rodzajów badań terenowych i laboratoryjnych – w przypadku gdy istnieją dowody *a posteriori* na to, że substancja chemiczna może wykazywać działanie zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego (np. działanie androgenne lub estrogenne w innych badaniach i testach), uzyskuje się inne użyteczne informacje, dokonując pomiaru mRNA witellogeniny (vtg) (lub białka witellogeniny, VTG), fenotypowych drugorzędowych cech płciowych (SSC) w odniesieniu do płci genetycznej oraz przeprowadza się ocenę histopatologiczną. Należy zauważyć, że jeżeli w przypadku badanej substancji chemicznej lub jej metabolitów nie zachodzi podejrzenie działania zaburzającego funkcjonowanie układu hormonalnego, wówczas pomiar tych drugorzędnych punktów końcowych może nie być konieczny, a bardziej odpowiednie mogą okazać się badania, w których wykorzystuje się mniej zasobów i zwierząt (1). Definicje stosowane w niniejszej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

▼M8

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

3. Ze względu na ograniczoną liczbę badanych substancji chemicznych i laboratoriów zaangażowanych w walidację tego dość złożonego testu przewiduje się, że gdy dostępna liczba badań będzie wystarczająca do ustalenia wpływu tego nowego projektu badania, wówczas metoda badawcza zostanie poddana przeglądowi i w razie potrzeby zmieniona w świetle zdobytych doświadczeń. Dane te można wykorzystać na poziomie 5 ram koncepcyjnych OECD w zakresie badania i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (3). Metoda badawcza rozpoczyna się od narażenia dorosłych ryb (pokolenie F0) na działanie badanej substancji chemicznej na etapie rozmnażania. Narażenie jest kontynuowane na etapach rozwoju i rozmnażania pokolenia F1 oraz wylęgu pokolenia F2; w ten sposób test pozwala na ocenę zarówno strukturalnych, jak i aktywacyjnych szlaków hormonalnych. Podczas interpretacji punktów końcowych związanych z układem hormonalnym można przyjąć podejście oparte na wadze dowodów.

4. W badaniu należy uwzględnić odpowiednią liczbę osobników, aby zapewnić wystarczającą podstawę do oceny punktów końcowych istotnych z perspektywy rozmnażania (zob. dodatek 3), przy jednoczesnym zapewnieniu, że liczba wykorzystywanych zwierząt stanowi minimum wymagane ze względów związanych z dobrostanem zwierząt. Ze względu na dużą liczbę zwierząt użytych do badania ważne jest, by starannie rozważyć potrzebę przeprowadzenia badania w odniesieniu do istniejących danych, które mogą już zawierać istotne informacje na temat wielu punktów końcowych w badaniu MEOGRT. Do pewnego stopnia pomocne w tym zakresie mogą być ramy OECD dotyczące badań toksyczności u ryb (1).

5. Przedmiotową metodę badawczą opracowano przede wszystkim w celu rozpoznania skutków działania pojedynczej substancji. Jeżeli jednak wymagane jest przeprowadzenie badania mieszaniny, wówczas należy rozważyć, czy przyniesie ono zadowalające wyniki w odniesieniu do zamierzonego celu regulacyjnego.

6. Ważne jest, aby przed rozpoczęciem badania posiadać informacje o właściwościach fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, w szczególności aby możliwe było tworzenie stabilnych roztworów chemicznych. Należy również posiadać odpowiednio czułą metodę analityczną na potrzeby weryfikacji stężeń badanych substancji chemicznych.

ZASADA BADANIA

7. Badanie rozpoczyna się od narażenia dojrzałych płciowo samców i samic (co najmniej 12 tygodni po zapłodnieniu) w parach hodowlanych przez okres 3 tygodni, w którym to czasie badania substancja chemiczna jest rozprowadzana w organizmie pokolenia rodzicielskiego (F0) zgodnie z jego zachowaniem toksykokinetycznym. Jaja zbiera się w czasie możliwie najbliższym pierwszego dnia czwartego tygodnia na potrzeby rozpoczęcia hodowli pokolenia F1. Podczas hodowli pokolenia F1 (łącznie 15 tygodni) ocenia się jego wylęgowość i przeżywalność. Ponadto w 9–10 tygodniu po zapłodnieniu pobiera się próbki ryb na potrzeby określenia rozwojowych punktów końcowych, a tarło ocenia się przez trzy tygodnie w okresie od 12 do 14 tygodnia po zapłodnieniu. Hodowla pokolenia F2 rozpoczyna się po trzecim tygodniu od oceny rozmnażania i trwa aż do zakończenia wylęgu.

KRYTERIA WAŻNOŚCI BADANIA

8. Zastosowanie mają następujące kryteria ważności badania:

— stężenie tlenu rozpuszczonego powinno wynosić ≥ 60 % wartości nasycenia powietrzem w trakcie badania;

— średnia temperatura wody w całym okresie trwania badania powinna wynosić 24–26 °C. Krótkotrwałe odchylenia temperatury poszczególnych akwariów od średniej nie powinny przekraczać 2 °C;

▼M8

— średni potencjał reprodukcyjny prób kontrolnych w każdym pokoleniu (F0 i F1) powinien być większy niż 20 jaj na parę dziennie. Płodność wszystkich jaj złożonych podczas oceny powinna wynosić powyżej 80 %. Ponadto 16 spośród zalecanych 24 par hodowlanych w próbie kontrolnej (> 65 %) powinno składać więcej niż 20 jaj na parę dziennie;

— wylęgowość jaj w próbach kontrolnych (w każdej z pokolenia F1 i F2) powinna wynosić (średnio) ≥ 80 %;

— przeżywalność po wylęgu do 3 tygodni po zapłodnieniu i od 3 tygodni po zapłodnieniu do zakończenia badania w przypadku pokolenia F1 (tj. 15 tygodni po zapłodnieniu) w próbach kontrolnych (F1) powinna wynosić odpowiednio ≥ 80 % (średnio) i ≥ 90 % (średnio);

— powinny być dostępne dowody pozwalające wykazać, że stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze utrzymano w granicach ± 20 % średnich wartości pomiarowych.

Jeżeli chodzi o temperaturę wody – mimo że nie stanowi ona kryterium ważności – kontrpróby użyte w ramach zabiegu, jak również grupy poddane zabiegowi w badaniu nie powinny statystycznie różnić się między sobą (pod względem codziennych pomiarów temperatury i z wyłączeniem krótkotrwałych odchyleń).

9. Chociaż w grupach o wyższym stopniu narażenia można zaobserwować spadek rozrodczości, rozrodczość w grupie co najmniej trzeciej pod względem stopnia narażenia i wszystkich grupach o niższym stopniu w pokoleniu F0 powinna być wystarczająca do wypełnienia inkubatorów wylęgowych. Ponadto przeżywalność embrionów w grupie trzeciej pod względem stopnia narażenia i w grupach o niższym stopniu narażenia w pokoleniu F1 powinna być wystarczająca do umożliwienia oceny punktu końcowego przy pobieraniu próbek osobników nie w pełni dojrzałych (zob. pkt 36 i 38 oraz dodatek 9). Co więcej, w grupie drugiej pod względem stopnia narażenia w pokoleniu F1 przeżywalność po wylęgu powinna być co najmniej na poziomie minimalnym (~20 %). Kryteria te jako takie nie stanowią kryteriów ważności, lecz są zaleceniami, które umożliwiają obliczenie wiarygodnej wartości NOEC.

10. W przypadku zaobserwowania odchylenia od kryteriów ważności badania skutki tych odchyleń należy przeanalizować w odniesieniu do wiarygodności wyników badania, a w sprawozdaniu z badania należy uwzględnić zarówno takie odchylenia, jak i dotyczące ich uwagi.

OPIS METODY

Aparatura

11. Zwykły sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

a) mierniki tlenu i pehametry;

b) sprzęt do oznaczania twardości i zasadowości wody;

c) odpowiednia aparatura do pomiaru temperatury, zalecane jest stałe monitorowanie;

d) zbiorniki wykonane z chemicznie obojętnego materiału o odpowiedniej objętości w zależności od zalecanego obciążenia i obsady (zob. dodatek 3);

e) waga o odpowiedniej dokładności (tj. dokładności do ±0,5 mg).

▼M8

Woda

12. Jako wodę do badań można stosować każdą wodę, w której badane gatunki wykazują odpowiednią długoterminową przeżywalność i wzrost. Jej jakość w okresie trwania badania powinna być stała. Aby upewnić się, że woda rozcieńczająca nie będzie wpływała zbytnio na wyniki badania (np. wchodząc w reakcję z badaną substancją chemiczną) lub nie będzie miała niekorzystnego wpływu na stado macierzyste, należy okresowo pobierać próbki wody do analizy. Jeżeli wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, należy oznaczać, np. co sześć miesięcy, zawartość metali ciężkich (np. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pestycydów, zawartość całkowitego węgla organicznego i zawiesinę ogólną. Niektóre właściwości chemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej wymieniono w dodatku 2. Wartość pH wody powinna mieścić się w zakresie 6,5–8,5, lecz w trakcie danego badania powinna mieścić się w zakresie ±0,5 jednostki pH.

Układ narażenia

13. Nie sprecyzowano projektu układu narażenia ani materiałów wykorzystywanych w tym układzie. Do konstrukcji układu badawczego należy użyć szkła, stali nierdzewnej lub innego chemicznie obojętnego materiału, który nie został zanieczyszczony podczas wcześniejszych badań. Na potrzeby niniejszego badania dobrze dopasowany układ narażenia może składać się z układu przepływowego (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Roztwory do badań

14. Roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej należy wprowadzić do układu narażenia, używając odpowiedniej pompy. Przed rozpoczęciem narażenia należy przeprowadzić kalibrację natężenia przepływu roztworu podstawowego zgodnie z analitycznym potwierdzeniem roztworów do badań, a podczas badania należy je okresowo sprawdzać objętościowo. Roztwór do badań w każdej komorze jest odpowiednio często wymieniany (np. minimalnie 5 wymian objętości na dzień do 16 wymian objętości na dzień lub do natężenia przepływu wynoszącego 20 ml/min) w zależności od stabilności badanej substancji chemicznej i jakości wody.

15. Roztwory do badań o wybranych stężeniach przygotowuje się przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Zaleca się przygotowanie roztworu podstawowego przez zwykłe wymieszanie lub zbełtanie badanej substancji chemicznej w wodzie rozcieńczającej w sposób mechaniczny (np. za pomocą mieszadła lub ultradźwięków). Do uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego można wykorzystać kolumny/układy nasyceniowe lub metody pasywnego dawkowania (14). Należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć wykorzystania rozpuszczalników lub nośników, ponieważ: 1) niektóre rozpuszczalniki same mogą powodować toksyczność lub niepożądane albo nieoczekiwane reakcje, 2) badanie substancji chemicznych, których rozpuszczalność w wodzie zostaje przekroczona (co często ma miejsce w wyniku stosowania rozpuszczalników), może skutkować niedokładnym określeniem stężeń efektywnych, 3) stosowanie rozpuszczalników w przypadku badań długoterminowych może skutkować znacznym rozrostem biofilmu związanym z aktywnością mikroorganizmów, co może wpłynąć na warunki środowiskowe, a także na zdolność do utrzymania stężenia podczas narażenia oraz 4) w przypadku braku danych historycznych, które potwierdziłyby brak wpływu rozpuszczalnika na wynik badania, użycie rozpuszczalników wymaga przeprowadzenia zabiegu z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem, co ma konsekwencje dla dobrostanu zwierząt, ponieważ przeprowadzenie badania wymaga użycia dodatkowych zwierząt. W przypadku substancji chemicznych, których badanie nastręcza trudności, rozpuszczalnik można zastosować tylko w ostateczności, a w celu wyboru najlepszej metody należy zapoznać się z wytyczną OECD nr 23 dotyczącą badania toksyczności wodnej trudnych substancji i mieszanin (Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures) (15). Wybór rozpuszczalnika będzie uwarunkowany właściwościami chemicznymi badanej substancji chemicznej i dostępnością danych historycznych dotyczących wykorzystania tego rozpuszczalnika. Jeżeli zastosowane zostaną nośniki rozpuszczalnikowe, oprócz prób kontrolnych bez rozpuszczalnika (ujemnych; z samą wodą rozcieńczającą) należy również ocenić odpowiednie próby kontrolne z rozpuszczalnikiem. W przypadku gdy nie

▼M8

można uniknąć użycia rozpuszczalnika, a występuje aktywność mikroorganizmów (biofilm), zaleca się rejestrowanie biofilmu na zbiornik (co najmniej raz w tygodniu) podczas całego badania. Najlepiej byłoby, gdyby stężenie rozpuszczalnika było utrzymywane na stałym poziomie w próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem i we wszystkich zabiegach. Jeżeli stężenie rozpuszczalnika nie jest utrzymywane na stałym poziomie, do próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem należy użyć jego najwyższego stężenia w próbie badanej poddanej działaniu substancji. W przypadkach gdy używane są nośniki rozpuszczalnikowe, maksymalne stężenia rozpuszczalnika nie powinny przekraczać 100 µl/l lub 100 mg/l (15), przy czym zaleca się, aby stężenie rozpuszczalnika pozostawało jak najniższe (np. < 20 µl/l), aby uniknąć potencjalnego wpływu rozpuszczalnika na mierzone punkty końcowe (16).

Zwierzęta użyte do badania

Wybór i utrzymywanie ryb

16. Badanym gatunkiem jest ryżanka japońska, *Oryzias latipes,* z powodu krótkiego cyklu rozwojowego i możliwości określenia płci genetycznej. Mimo że inne gatunki małych ryb można przystosować do podobnego protokołu badania, konkretne metody i punkty końcowe obserwacji wyszczególnione w niniejszej metodzie badawczej mają zastosowanie wyłącznie do ryżanki japońskiej (zob. pkt 1). Ryżanka japońska łatwo rozmnaża się w niewoli; dostępne są publikacje na temat jej hodowli (17)(18)(19) oraz dane z badań nad krótkoterminową upadkowością, wczesnym etapem życia i pełnym cyklem rozwojowym (5)(6)(8)(9)(20). Fotoperiod dla wszystkich ryb utrzymuje się w stosunku 16 godzin światła do 8 godzin bez dostępu światła. Ryby będą karmione żywymi larwami solowca, *Artemia* spp., które w razie potrzeby można uzupełniać dostępnym na rynku pokarmem w płatkach. Dostępny na rynku pokarm w płatkach należy regularnie analizować pod kątem obecności zanieczyszczeń.

17. O ile przestrzegane są praktyki gospodarskie, nie wymaga się konkretnego protokołu hodowlanego. Przykładowo ryżankę japońską można hodować w zbiornikach o pojemności 2 l po 240 ryb w fazie larwalnej do 4 tygodnia po zapłodnieniu, a następnie można ją hodować w zbiornikach o pojemności 2 l po 10 ryb do 8 tygodnia po zapłodnieniu, kiedy to ryby łączy się w pary hodowlane w zbiornikach o pojemności 2 l.

Aklimatyzacja i wybór ryb

18. Badane ryby należy wybrać z jednego laboratoryjnego stada, które przez co najmniej dwa tygodnie przed badaniem było aklimatyzowane w warunkach jakości wody i oświetlenia zbliżonych do stosowanych w badaniu (uwaga: ten okres aklimatyzacji nie jest okresem poprzedzającym narażenie *in situ*). Zaleca się pozyskiwanie ryb do badań z hodowli wewnątrzlaboratoryjnej, ponieważ wysyłka dorosłych ryb jest stresująca i może wpłynąć na wiarygodność tarła. Ryby należy karmić larwami solowca dwa razy dziennie przez cały okres utrzymywania i na etapie narażenia, w razie potrzeby dokarmiając je dostępnym na rynku pokarmem w płatkach. Uznaje się, że – aby zapewnić odpowiednie kontrpróby – do rozpoczęcia niniejszego badania niezbędne są co najmniej 42 pary hodowlane (54 pary hodowlane, jeżeli wymagane jest przeprowadzenie próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem, częściowo z powodu braku danych historycznych na poparcie użycia wyłącznie próby kontrolnej bez rozpuszczalnika). Ponadto należy sprawdzić, czy każda z par hodowlanych z pokolenia F0 posiada chromosomy XX-XY (tj. zwyczajny zestaw chromosomów płci w przypadku każdej płci), aby uniknąć możliwości uwzględnienia protogynicznych samców z chromosomami XX (zob. pkt 39).

▼M8

19. Na etapie aklimatyzacji należy odnotowywać śmiertelność ryb hodowlanych, a po 48-godzinnym okresie adaptacji stosuje się następujące kryteria:

— śmiertelność przekracza 10 % populacji hodowli w ciągu siedmiu dni poprzedzających przeniesienie do układu badawczego: należy odrzucić całą partię;

— śmiertelność na poziomie 5–10 % populacji hodowli w ciągu siedmiu dni poprzedzających przeniesienie do układu badawczego: aklimatyzacja przez siedem dodatkowych dni po 2-tygodniowym okresie aklimatyzacji; jeżeli śmiertelność przekroczy 5 % w ciągu tych siedmiu dni, należy odrzucić całą partię;

— śmiertelność poniżej 5 % populacji w ciągu siedmiu dni poprzedzających przeniesienie do układu badawczego: należy zaakceptować partię.

20. Ryb nie należy leczyć na żadną chorobę w 2-tygodniowym okresie aklimatyzacji poprzedzającym badanie ani w okresie narażenia i należy zupełnie unikać leczenia chorób, o ile jest to możliwe. Ryb przejawiających kliniczne objawy choroby nie należy wykorzystywać do badań. W okresie hodowlanym poprzedzającym badanie należy prowadzić rejestr obserwacji oraz zabiegów medycznych o charakterze prewencyjnym i postępowań terapeutycznych.

21. Etap narażenia rozpoczyna się z wykorzystaniem dorosłych ryb wykazujących dymorfizm płciowy z laboratoryjnego źródła zwierząt dojrzałych płciowo, u których rozpoznano płeć genetyczną, hodowanych w temperaturze 25 ± 2 °C. W tygodniu poprzedzającym narażenie ryby należy zidentyfikować jako potwierdzone samce i samice rozpłodowe (tj. takie, które wydały żywe potomstwo). W odniesieniu do całej grupy ryb wykorzystanych w badaniu zakres poszczególnych mas z podziałem na płeć na początku badania należy utrzymać w zakresie ± 20 % średniej arytmetycznej masy dla tej samej płci. Przed rozpoczęciem badania należy zważyć podpróbkę ryb w celu oszacowania średniej masy. Wybrane ryby powinny być w wieku przynajmniej 12 tygodni po zapłodnieniu, co oznacza masę ≥ 300 mg w przypadku samic i ≥ 250 mg w przypadku samców.

PROJEKT BADANIA

Badane stężenia

22. Zaleca się wykorzystanie pięciu stężeń substancji chemicznej oraz próbę kontrolną (próby kontrolne). Przy wyborze zakresu badanych stężeń należy wziąć pod uwagę wszystkie źródła informacji, w tym ilościowe zależności struktura-aktywność (QSAR), podejścia przekrojowe z zastosowaniem analogicznych substancji, wyniki badań na rybach, takich jak testy toksyczności ostrej (zob. rozdział C.1 niniejszego załącznika), krótkoterminowy test rozrodczości ryb (zob. rozdział C.48 niniejszego załącznika) oraz inne metody badawcze, np. opisane w rozdziałach C.15, C.37, C.41, C.47 lub C.49 niniejszego załącznika (21)(22)(23)(24)(25)(26), o ile są dostępne, lub jeżeli to konieczne, informacje z badania ustalającego zakres stężeń, możliwie z uwzględnieniem etapu rozmnażania. W razie potrzeby badanie ustalające zakres stężeń można przeprowadzić w warunkach podobnych do tych, w których przeprowadza się badanie ostateczne (pod względem jakości wody, układu badawczego, wprowadzania zwierząt). W przypadku gdy konieczne jest użycie rozpuszczalnika i nie są dostępne żadne dane historyczne, można przeprowadzić badanie ustalające zakres stężeń w celu określenia stosowności rozpuszczalnika. Najwyższe badane stężenie nie powinno przekraczać rozpuszczalności w wodzie, 10 mg/l lub 1/10 LC_{50} po upływie 96 godzin (27). Najniższe stężenie powinno być 10–100-krotnie niższe od najwyższego stężenia. Użycie pięciu stężeń w niniejszym badaniu umożliwia nie tylko pomiar zależności dawka-odpowiedź, ale również pozwala określić najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC) i najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) – wartości te są niezbędne do oceny ryzyka w niektórych programach regulacyjnych lub jurysdykcjach. Co do zasady

▼M8

współczynnik rozstawienia stężeń nominalnych badanej substancji chemicznej pomiędzy sąsiadującymi poziomami zabiegów wynosi ≤ 3,2.

Kontrpróby grup poddanych zabiegowi i prób kontrolnych

23. Należy użyć co najmniej sześciu komór badawczych stanowiących kontrpróby na każde badane stężenie (zob. dodatek 7). Na etapie rozmnażania (z wyjątkiem pokolenia F0) struktura kontrprób zostaje podwojona na potrzeby oceny potencjału reprodukcyjnego, a każda kontrpróba zawiera tylko jedną parę hodowlaną (zob. pkt 42).

24. Oprócz badanych stężeń należy również wykonać próbę kontrolną z wodą rozcieńczającą oraz – w razie potrzeby – próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem. W próbach kontrolnych należy użyć podwójnej liczby komór stanowiących kontrpróby, aby zapewnić odpowiednią moc statystyczną (tj. w próbach kontrolnych należy wykorzystać co najmniej dwanaście kontrprób). Na etapie rozmnażania liczbę kontrprób w próbach kontrolnych podwaja się (tj. wykorzystuje się minimalnie 24 kontrpróby, a każda z nich zawiera tylko jedną kojarzoną parę). Po rozmnażaniu kontrpróby kontrolne nie powinny zawierać więcej niż 20 zarodków (ryb).

PROCEDURA

Rozpoczęcie badania

25. Aktywne rozrodczo dorosłe ryby wykorzystywane do rozpoczęcia pokolenia F0 w badaniu wybiera się według dwóch kryteriów: wieku (zwykle powyżej 12 tygodni po zapłodnieniu, ale zaleca się nie później niż 16 tygodni po zapłodnieniu) i masy (powinna wynosić ≥ 300 mg w przypadku samic i ≥ 250 mg w przypadku samców).

26. Na początku badania pary samica-samiec, które spełniają powyższe warunki, przenosi się jako pojedyncze pary do każdego ze zbiorników kontrpróby, tj. do dwunastu kontrprób w próbach kontrolnych i sześciu kontrprób w grupie poddanej działaniu substancji chemicznej. Zbiornikom tym losowo przypisuje się zabieg (np. T1–T5 i próba kontrolna) i kontrpróbę (np. A–L przypisuje się do prób kontrolnych, a A–F przypisuje się do zabiegu), a następnie umieszcza się je w układzie narażenia, zapewniając odpowiedni przepływ do każdego ze zbiorników.

Warunki narażenia na działanie substancji

27. Pełne streszczenie parametrów i warunków badań można znaleźć w dodatku 3. Stosowanie się do tych specyfikacji powinno pozwolić uzyskać ryby z próby kontrolnej, których wartości punktów końcowych są podobne do tych wymienionych w dodatku 4.

28. W trakcie badania należy dokonywać pomiarów rozpuszczonego tlenu, pH i temperatury w co najmniej jednym naczyniu do badania każdej grupy poddawanej działaniu substancji i w próbie kontrolnej. Z wyjątkiem temperatury, pomiarów tych należy dokonywać przynajmniej raz w tygodniu przez cały okres narażenia. Średnia temperatura wody powinna wynosić od 24–26 °C przez cały okres trwania badania. Temperaturę należy mierzyć codziennie przez cały okres narażenia. Wartość pH wody powinna mieścić się w zakresie 6,5–8,5, lecz w trakcie danego badania powinna mieścić się w zakresie ± 0,5 jednostki pH. Kontrpróby użyte w ramach zabiegu, jak również grupy poddane zabiegowi w badaniu nie powinny statystycznie różnić się między sobą (pod względem codziennych pomiarów temperatury i z wyłączeniem krótkotrwałych odchyleń).

▼M8

Czas narażenia

29. W ramach badania ryby zdolne do rozmnażania z pokolenia F0 naraża się na działanie substancji przez okres trzech tygodni. W 4 tygodniu, około 24. dnia badania, ustanawia się pokolenie F1, zaś pary hodowlane z pokolenia F0 uśmierca się w sposób humanitarny i odnotowuje się ich masę i długość (zob. pkt 34). Następnie pokolenie F1 naraża się na działanie substancji przez kolejne 14 tygodni (łącznie 15 tygodni w przypadku F1), a pokolenie F2 naraża się przez dwa tygodnie, do czasu wylęgu. Zasadniczo łączny czas trwania badania wynosi 19 tygodni (tj. do czasu wylęgu pokolenia F2). Harmonogramy badania przedstawiono w tabeli 2, a bardziej szczegółowe informacje na ten temat można znaleźć w dodatku 9.

Schemat żywienia

30. Ryby można bez ograniczeń karmić solowcami *Artemia* spp. (24-godzinnymi larwami), dokarmiając w razie potrzeby dostępnym na rynku pokarmem w płatkach. Dostępny na rynku pokarm w płatkach należy regularnie oceniać pod kątem obecności zanieczyszczeń, takich jak pestycydy chloroorganiczne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), polichlorowane bifenyle (PCB). Należy unikać pokarmów o podwyższonej zawartości związków endokrynnie czynnych (tj. fitoestrogenów), które mogłyby zakłócić reakcję w trakcie badania. Niezjedzony pokarm i odchody należy usuwać z naczyń badawczych według potrzeby, np. ostrożnie czyszcząc dno każdego zbiornika za pomocą syfonu. Ściany i dno każdego zbiornika należy również czyścić raz lub dwa razy w tygodniu (np. skrobiąc szpatułką). Przykładowy schemat żywienia można znaleźć w dodatku 5. Częstotliwość karmienia zależy od liczby ryb w każdej kontrpróbie. A zatem częstotliwość karmienia zmniejsza się, jeżeli w kontrpróbie występuje śmiertelność.

Oznaczenie i pomiary analityczne

31. Przed rozpoczęciem okresu narażenia należy upewnić się, że system podawania substancji chemicznej działa prawidłowo. Należy ustalić wszystkie potrzebne metody analityczne, w tym zgromadzić dostateczną wiedzę na temat stabilności substancji chemicznej w układzie badawczym. W trakcie badania stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w odpowiednich odstępach czasu, najlepiej co najmniej raz na tydzień w jednej kontrpróbie z każdej grupy poddanej zabiegowi, co tydzień zmieniając kontrpróby w ramach tej samej grupy poddanej zabiegowi.

32. W trakcie badania należy w odpowiednich odstępach czasu sprawdzać natężenie przepływów rozcieńczalnika i roztworu podstawowego (np. co najmniej trzy razy w tygodniu). Zaleca się, aby wyniki były oparte na mierzonych stężeniach. Jeżeli jednak stężenie badanej substancji chemicznej w roztworze można z powodzeniem utrzymywać w zakresie ± 20 % średnich zmierzonych wartości przez cały okres badania, wówczas wyniki mogą opierać się albo na wartościach nominalnych, albo na wartościach zmierzonych. W przypadku substancji chemicznych, które wyraźnie odkładają się w rybach, badane stężenia mogą maleć wraz ze wzrostem ryb. W takich przypadkach zaleca się dostosowanie tempa wymiany roztworu do badań w każdej komorze w taki sposób, aby badane stężenia pozostały możliwie jak najbardziej stałe.

Obserwacje i pomiar punktów końcowych

33. Pomiar punktów końcowych obejmuje potencjał reprodukcyjny, płodność, wylęg, wzrost i przeżywalność, które to wartości wykorzystuje się do oceny możliwych skutków na poziomie populacji. Należy również codziennie dokonywać obserwacji zachowania, a wszelkie nietypowe zachowania należy odnotowywać. Inne mechanistyczne punkty końcowe obejmują poziom mRNA *vtg* z wątroby lub poziom białka VTG według testu immunologicznego (28), fenotypowe markery płci, takie jak charakterystyczne brodawki płetwy odbytowej samców, histologiczną ocenę płci gonadalnej i histopatologiczną ocenę nerki, wątroby i gonady (zob. wykaz punktów końcowych w tabeli 1). Wszystkie te konkretne punkty końcowe ocenia się w kontekście określania płci genetycznej jednostki na podstawie obecności lub braku genu *dmy,* determinującego płeć męską u ryżanki japońskiej (zob. pkt 41). Ponadto ocenia się również czas

▼M8

do tarła. Co więcej, wykorzystując liczbę brodawek płetwy odbytowej do określenia poszczególnych ryżanek japońskich jako fenotypowych samców albo samic, można obliczyć proste fenotypowe proporcje płci. Od niniejszej metody badawczej nie oczekuje się wykrycia niewielkich odchyleń od przewidywanego stosunku płci, ponieważ względnie niewielka liczba ryb przypadająca na kontrpróbę nie będzie miała wystarczającej mocy statystycznej. Ponadto podczas oceny histopatologicznej bada się gonadę i przeprowadza się dużo bardziej zaawansowane analizy na potrzeby oceny fenotypu gonad w kontekście płci genetycznej.

34. Podstawowym celem niniejszej metody badawczej jest ocena istotnych dla populacji, potencjalnych skutków działania badanej substancji chemicznej. Mechanistyczne punkty końcowe (VTG, SSC i niektóre histopatologiczne efekty na gonadach) mogą również pomóc w określeniu, czy któryś ze skutków powstaje w wyniku zakłócenia funkcjonowania układu hormonalnego. Wpływ na powyższe mechanistyczne punkty końcowe mogą jednak mieć również toksyczność ogólnoustrojowa i inne toksyczności. W związku z tym szczegółowej ocenie można również poddać badanie histopatologiczne wątroby i nerek, aby lepiej zrozumieć reakcje w mechanistycznych punktach końcowych. Jeżeli jednak te szczegółowe oceny nie są przeprowadzane, należy mimo to odnotować i zgłosić poważne nieprawidłowości zaobserwowane przypadkowo podczas oceny histopatologicznej.

Humanitarne uśmiercanie ryb

35. Po zakończeniu narażenia pokolenia F0 i F1 na działanie substancji i przy pobieraniu podprób ryb nie w pełni dojrzałych ryby należy poddać eutanazji, podając im odpowiednie ilości roztworu środka znieczulającego (np. metanosulfonioanu trikainy, MS-222 (nr CAS 886-86-2), 100–500 mg/l) zbuforowanego 300 mg/l $NaHCO_3$ (wodorowęglan sodu, nr CAS 144-55-8) w celu zmniejszenia podrażnienia błony śluzowej. Jeżeli ryby wykazują oznaki znacznego cierpienia (bardzo poważnego, a ich śmierć można wiarygodnie przewidzieć) i uznaje się je za konające, zwierzęta należy znieczulić i poddać eutanazji oraz traktować jako przypadki śmiertelne do celów analizy danych. W przypadku poddania ryby eutanazji z powodu choroby należy to odnotować i zgłosić. W zależności od momentu badania, w którym rybę poddaje się eutanazji, zwierzę można zachować na potrzeby analizy histopatologicznej (utrwalając rybę na potrzeby ewentualnego badania histopatologicznego).

Postępowanie z jajami i rybami w fazie larwalnej

Pobieranie jaj od par hodowlanych w celu utworzenia następnego pokolenia

36. Pobieranie jaj ma miejsce pierwszego dnia (lub w ciągu pierwszych dwóch dni, jeśli to konieczne) 4 tygodnia badania, aby przejść z pokolenia F0 do pokolenia F1, oraz 18 tygodnia badania, aby przejść z pokolenia F1 do pokolenia F2. 18 tydzień badania odpowiada dorosłym rybom w pokoleniu F1, 15 tygodni po zapłodnieniu. Ważne jest usunięcie wszystkich jaj z każdego zbiornika na dzień przed rozpoczęciem pobierania, aby upewnić się, że wszystkie jaja pobrane od pary hodowlanej pochodzą z jednego tarła. Po tarle samice ryżanki japońskiej niekiedy transportują jaja przyczepione w pobliżu kloaki do czasu, gdy możliwe będzie złożenie ich na podłożu. Jeśli w zbiorniku nie ma podłoża, jaja można znaleźć na samicy albo na dnie zbiornika. W zależności od umiejscowienia jaj należy je ostrożnie zdjąć z samicy albo pobrać z dna zbiornika przy pomocy syfonu – w 4 tygodniu badania w przypadku pokolenia F0 i w 18 tygodniu badania w przypadku pokolenia F1. Przed rozmieszczeniem w komorach inkubacyjnych wszystkie jaja pobrane w ramach zabiegu należy umieścić razem.

▼M8

37. Należy usunąć wstęgi otaczające złożone jaja, które spajają je ze sobą. Zapłodnione jaja (do 20) pobiera się od każdej pary hodowlanej (1 para na kontrpróbę), gromadzi się je według zabiegu i systematycznie rozmieszcza w odpowiednich komorach inkubacyjnych (dodatki 6 i 7). Za pomocą dobrej jakości mikroskopu stereoskopowego można dostrzec oznaki wczesnego zapłodnienia/rozwoju, takie jak podniesienie osłony jajowej (chorionu), trwający podział komórkowy czy tworzenie się blastuli. Komory inkubacyjne można umieścić w oddzielnych „akwariach inkubacyjnych" utworzonych na potrzeby każdego zabiegu (w którym to przypadku w akwariach tych należy mierzyć parametry jakości wody i stężenia badanych substancji chemicznych) lub w akwarium stanowiącym kontrpróbę, w którym będą znajdować się wyklute larwy (np. eleuteroembriony). W przypadku konieczności pobrania jaj kolejnego dnia (23. dzień badania) wszystkie jaja zebrane w ciągu dwóch dni należy umieścić razem, a następnie systematycznie rozmieścić w każdej z kontrprób poddawanych zabiegowi.

Hodowanie jaj do czasu wylęgu

38. Zapłodnione jaja są stale wstrząsane, np. w inkubatorze do jaj za pomocą pęcherzyków powietrza lub poprzez wprowadzanie inkubatora jaj w pionowy ruch wahadłowy. Śmiertelność zapłodnionych jaj (zarodków) sprawdza się i odnotowuje codziennie. Martwe jaja usuwa się z inkubatorów (dodatek 9). W siódmym dniu po zapłodnieniu wstrząsanie wstrzymuje się lub ogranicza, aby zapłodnione jaja osiadły na dnie inkubatora. Sprzyja to wylęganiu, które ma miejsce zazwyczaj następnego dnia lub w ciągu dwóch dni. W odniesieniu do każdego zabiegu i każdej próby kontrolnej należy zliczyć (w połączonych kontrpróbach) wylęg (młode larwy; eleuteroembriony). Zapłodnione jaja, z których młode nie wykluły się po upłynięciu dwukrotności mediany dnia wylęgu w próbie kontrolnej (zazwyczaj 16 lub 18 dnia po zapłodnieniu), uznaje się za niezdolne do życia i odrzuca.

39. Dwanaście wylęgów przenosi się do każdego zbiornika z kontrpróbą. Wylęg z komór inkubacyjnych łączy się i systematycznie rozmieszcza w zbiornikach z kontrpróbą (dodatek 7). Można tego dokonać poprzez losowy dobór wylęgu z puli przeznaczonej do zabiegu i późniejsze losowe dodawanie wylęgu do akwarium z kontrpróbą. Każdy zbiornik powinien zawierać równą liczbę (n = 12) wyklutych larw (maksymalnie 20 larw na każdy zbiornik). Jeżeli liczba osobników w wylęgu nie jest wystarczająca, by wypełnić wszystkie kontrpróby poddawane zabiegowi, zaleca się, aby jak najwięcej kontrprób zawierało 12 osobników z wylęgu. Wylęg można bezpiecznie przenosić za pomocą szklanych pipet o dużych otworach. Wszelkie dodatkowe osobniki w wylęgu uśmierca się w sposób humanitarny, podając środek znieczulający. W ciągu kilku tygodni poprzedzających ustanowienie par hodowlanych należy odnotować dzień, w którym zaobserwowano pierwsze tarło w każdej kontrpróbie.

Ustanawianie par hodowlanych

Znakowanie przez obcinanie płetw i określenie płci genetycznej

40. Określenie płci genetycznej za pomocą znakowania poprzez obcinanie płetw wykonuje się w 9–10 tygodniu po zapłodnieniu (tj. 12–13 tydzień badania w przypadku pokolenia F1). Wszystkie ryby w zbiorniku znieczula się (korzystając z zatwierdzonych metod, np. IACUC) i z końca płetwy ogonowej po stronie grzbietowej albo brzusznej od każdej ryby pobiera się niewielką próbkę tkanki w celu określenia płci genetycznej osobnika (29). Ryby z kontrpróby można trzymać w małych sadzach, w miarę możliwości po jednej na sadzę, w zbiorniku z kontrpróbą. Ewentualnie w każdej sadzy można trzymać dwie ryby, jeżeli można je od siebie odróżnić. Jedną z metod rozróżnienia jest przecięcie płetwy ogonowej (np. na brzegu po stronie grzbietowej lub brzusznej) podczas pobierania próbki tkanki.

▼M8

41. Płeć genetyczną ryżanki japońskiej określa się za pomocą zidentyfikowanego i zsekwencjonowanego genu (*dmy*), który znajduje się na chromosomie Y. Obecność geny *dmy* wskazuje, że osobnik posiada chromosomy XY niezależnie od fenotypu, natomiast brak genu *dmy* wskazuje, że osobnik posiada chromosomy XX niezależnie od fenotypu (30); (31). Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) pobierany jest z każdego odciętego fragmentu płetwy, a obecność genu *dmy* lub jego brak można, korzystając z metod łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) (zob. dodatek 9 do rozdziału C.41 niniejszego załącznika lub dodatki 3 i 4 w (29).

Ustanawianie par hodowlanych

42. Informacje na temat płci genetycznej wykorzystuje się do ustalenia par hodowlanych posiadających chromosomy XX–XY niezależnie od fenotypu zewnętrznego, który może zmienić się w wyniku narażenia na działanie badanej substancji chemicznej. W dniu następującym po określeniu płci genetycznej każdej ryby z każdej kontrpróby losowo wybiera się dwie ryby posiadające chromosomy XX i dwie ryby posiadające chromosomy XY i ustanawia się dwie pary hodowlane posiadające chromosomy XX–XY. Jeżeli kontrpróba nie zawiera dwóch ryb posiadających chromosomy XX albo XY, należy pozyskać odpowiednią rybę z innych kontrprób w ramach zabiegu. Priorytetem jest, aby w każdym zabiegu i w każdej próbie kontrolnej (24) znajdowała się zalecana liczba kontrprób zawierających pary hodowlane (12). Przy ustanawianiu par hodowlanych wyklucza się ryby posiadające oczywiste nieprawidłowości (problemy z pęcherzem pławnym, deformacje kręgosłupa, ekstremalnie różniące się pod względem rozmiaru itp.). Na etapie rozmnażania pokolenia F1 każdy zbiornik z kontrpróbą powinien zawierać tylko jedną parę hodowlaną.

Pobieranie próbek od osobników nie w pełni dojrzałych i ocena punktów końcowych

Pobieranie próbek od ryb niebędących parami hodowlanymi

43. Po ustanowieniu par hodowlanych ryby niewybrane do dalszej hodowli uśmierca się w sposób humanitarny w 12–13 tygodniu badania (pokolenie F1) w celu pomiaru punktów końcowych osobników nie w pełni dojrzałych. Niezwykle ważne jest przenoszenie ryb w taki sposób, aby nadal można było określić płeć genetyczną każdej ryby wybranej do pary hodowlanej. Wszystkie zebrane dane analizuje się w kontekście płci genetycznej danej ryby. Każdą rybę wykorzystuje się do pomiaru różnych punktów końcowych, w tym: do określenia wskaźników przeżywalności ryb młodych / nie w pełni dojrzałych (7–12/13 tydzień badania (pokolenie F1)), wzrostu długości (jeżeli płetwę ogonową skrócono w związku z pobieraniem próbek na potrzeby analizy płci genetycznej, można zmierzyć długość standardową. Długość całkowitą można zmierzyć, jeżeli jako próbki pobrano tylko część płetwy ogonowej, po stronie grzbietowej lub brzusznej, na potrzeby określenia obecności genu *dmy)* i masy ciała (tj. mokrej masy, osuszone na bibule), *vtg* mRNA wątroby (lub VTG) i brodawek płetwy odbytowej (zob. tabele 1 i 2). Należy pamiętać, że wartości mas i długości par hodowlanych są również potrzebne do obliczenia średniego wzrostu w grupie poddanej zabiegowi.

Pobieranie próbek tkanek i pomiar witellogeniny

44. Wątrobę wycina się i należy ją przechowywać w temperaturze ≤ -70 °C do czasu wykonania pomiarów *vtg* mRNA (lub VTG). Ogon ryby, w tym płetwę odbytową, przechowuje się w odpowiednim utrwalaczu (np. Davidsona) lub fotografuje w taki sposób, aby później można było policzyć brodawki płetwy odbytowej. W razie potrzeby w tym czasie można pobierać i przechowywać próbki innych tkanek (np. gonad). Stężenie VTG w wątrobie należy oznaczyć ilościowo za pomocą homologicznej metody ELISA (zob. procedury zalecane w odniesieniu do ryżanki japońskiej – w dodatek 6 do rozdziału C.48 w niniejszym załączniku). Ewentualnie można skorzystać z metod oznaczania ilościowego mRNA vtg, tj. ekstrakcji mRNA genu *vtg I* z próbki wątroby oraz oznaczenia ilościowego liczby kopii genu *vtg I* (przypadających na nanogram całkowitego mRNA) metodą ilościowego PCR (29), określonych przez Agencję Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych. Zamiast określania liczby kopii genu

▼M8

vtg w grupie kontrolnej i grupie poddanej zabiegowi można zastosować metodę bardziej korzystną pod względem zasobów i mniej trudną z technicznego punktu widzenia, jaką jest określenie względnej (wielokrotności) zmiany ekspresji genu *vtg I* w grupie kontrolnej i grupie poddanej zabiegowi.

Drugorzędowe cechy płciowe

45. W normalnych warunkach jedynie dojrzałe płciowo samce ryżanki japońskiej mają brodawki, które rozwijają się jako drugorzędna cecha płciowa na płytkach łączących niektóre promienie płetwy odbytowej, stanowiąc potencjalny biomarker zaburzeń funkcjnowania układu hormonalnego. Metodę liczenia brodawek płetwy odbytowej (liczby płytek łączących posiadających brodawki) przedstawiono w dodatku 8. Liczbę brodawek płetwy odbytowej przypadających na osobnika wykorzystuje się również do klasyfikacji tego osobnika jako samca lub samicy pod względem fenotypowych cech zewnętrznych do celów obliczenia prostych proporcji płci w kontrpróbie. Ryżankę japońską posiadającą dowolną liczbę brodawek większą niż 0 określa się jako samca; ryżankę japońską pozbawioną brodawek płetwy odbytowej określa się jako samicę.

Ocena potencjału reprodukcyjnego i płodności

46. Potencjał reprodukcyjny i płodność ocenia się w okresie od 1. do 3. tygodnia badania w pokoleniu F0 oraz w okresie od 15. do 17. tygodnia badania w pokoleniu F1. Jaja pobiera się od każdej pary hodowlanej każdego dnia przez 21 następujących po sobie dni. Każdego ranka jaja delikatnie zdejmuje się ze złapanych samic lub pobiera się przy pomocy syfonu z dna akwarium. W odniesieniu do każdej pary hodowlanej w kontrpróbie codziennie odnotowuje się zarówno potencjał reprodukcyjny, jak i płodność. Potencjał reprodukcyjny określa się jako liczbę złożonych jaj, natomiast płodność funkcjonalnie określa się jako liczbę jaj zapłodnionych i zdolnych do przeżycia w momencie liczenia. Liczenie należy przeprowadzić jak najszybciej po zebraniu jaj.

47. Codziennie odnotowuje się potencjał reprodukcyjny kontrpróby, który rozumie się jako liczbę jaj przypadających na parę hodowlaną i który analizuje się za pomocą zalecanych procedur statystycznych z wykorzystaniem średnich kontrprób. Płodność kontrpróby to suma liczby zapłodnionych jaj złożonych przez parę hodowlaną podzielona przez sumę liczby jaj złożonych przez tę parę. Statystycznie płodność analizuje się jako stosunek przypadający na każdą kontrpróbę. Wylęgowość kontrpróby to liczba osobników w wylęgu podzielona przez liczbę badanych zarodków (zazwyczaj 20). Statystycznie wylęgowość analizuje się jako stosunek przypadający na każdą kontrpróbę.

Pobieranie próbek od osobników dorosłych i ocena punktów końcowych

Pobieranie próbek od par hodowlanych ryb

48. Po upływie 17. tygodnia badania (tj. po pomyślnym utworzeniu pokolenia F2) osobniki dorosłe z pokolenia F1 uśmierca się w sposób humanitarny i ocenia się różne punkty końcowe (zob. tabele 1 i 2). Na potrzeby oceny brodawek płetwy odbytowej tworzy się obraz płetwy odbytowej (zob. dodatek 8) lub na potrzeby późniejszego liczenia brodawek ogon odcina się tuż za kloaką i utrwala się go. W razie potrzeby w tym czasie można pobrać próbki z części płetwy ogonowej i zachować je do celów weryfikacji płci genetycznej (*dmy*). W razie potrzeby można pobrać próbkę tkanki na potrzeby powtórzenia badania na obecność genu *dmy*, aby zweryfikować płeć genetyczną konkretnych ryb. Przed zanurzeniem całego ciała w utrwalaczu należy otworzyć jamę ciała, aby umożliwić perfuzję odpowiednich utrwalaczy (np. Davidsona). Jeżeli natomiast przed utrwaleniem wykonano odpowiednie działania mające zapewnić przenikalność, nie ma potrzeby otwierania jamy ciała.

▼M8

Histopatologia

49. Każdą rybę poddaje się ocenie histologicznej pod kątem występowania zmian patologicznych w tkance gonad (30); (29). Jak wspomniano w pkt 33, toksyczność ogólnoustrojowa i inne toksyczności mogą wywierać wpływ na inne mechanistyczne punkty końcowe oceniane w niniejszym teście (tj. VTG, SSC i niektóre histopatologiczne efekty w obrębie gonad). W związku z tym szczegółowej ocenie można również poddać badanie histopatologiczne wątroby i nerek, aby lepiej zrozumieć reakcje w mechanistycznych punktach końcowych. Jeżeli jednak te szczegółowe oceny nie są przeprowadzane, należy mimo to odnotować i zgłosić poważne nieprawidłowości zaobserwowane przypadkowo podczas oceny histopatologicznej. Można rozważyć odczytywanie wyników w kolejności od najwyższego do najniższego, tj. zaczynając od grupy poddanej zabiegowi, w której zaobserwowano największy wpływ (w porównaniu z próbą kontrolną), a kończąc na grupie poddanej zabiegowi, w której nie odnotowano żadnego wpływu, choć zaleca się zapoznanie z wytycznymi w zakresie histopatologii (29). Zwykle wszystkie próbki najpierw poddaje się obróbce/dzieli na skrawki, a następnie odczytuje je patolog. W przypadku stosowania podejścia opartego na odczytywaniu wyników w kolejności od najwyższego do najniższego należy zauważyć, że w procedurze RSCABS (ang. *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices*) wykorzystuje się założenie, że wraz ze wzrostem poziomów dawek zwiększy się również wpływ biologiczny (patologia). A zatem w przypadku analizy wyłącznie jednej wysokiej dawki bez żadnych dawek pośrednich straci ona swoją moc. Podejście to może być dopuszczalne w przypadku, gdy analiza statystyczna nie jest konieczna do ustalenia, że wysoka dawka nie wywiera żadnego wpływu. Badanie to pozwala również określić fenotyp gonad.

Pozostałe obserwacje

50. Badanie MEOGRT pozwala uzyskać dane, które można wykorzystać (np. podejście oparte na wadze dowodów) do jednoczesnej oceny co najmniej dwóch ogólnych rodzajów mechanizmów wywoływania skutków szkodliwych (AOP) prowadzących do upośledzenia funkcji rozrodczych: a) mechanizmy o podłożu endokrynnym obejmujące zakłócenie funkcjonowania osi hormonalnej podwzgórze–przysadka–gonady (HPG); oraz b) mechanizmy, które powodują obniżenie przeżywalności, wzrostu (długości i masy) oraz rozrodczości poprzez toksyczność o podłożu innym niż endokrynne. Badanie to obejmuje również punkty końcowe, które zwykle mierzy się w badaniach przewlekłej toksyczności, jak np. badanie pełnego cyklu życia i badanie wczesnego etapu życia, które to punkty można wykorzystać do oceny zagrożeń stwarzanych zarówno przez toksyczne sposoby działania o podłożu endokrynnym, jak i przez mechanizmy toksyczności o podłożu innym niż endokrynne. Podczas badania należy codziennie obserwować zachowanie i odnotowywać wszelkie nietypowe zachowania. Ponadto należy odnotować każdy przypadek śmiertelny i obliczyć przeżywalność ryb do momentu eliminacji (6/7 tydzień badania), przeżywalność po eliminacji na potrzeby pobierania próbek od osobników nie w pełni dojrzałych (w 9–10 tygodniu po zapłodnieniu) oraz przeżywalność od momentu sparowania do momentu pobrania próbek od dorosłych ryb.

Tabela 1

Przegląd punktów końcowych badania MEOGRT (*)

Etap życia	Punkt końcowy	Pokolenie
Zarodek (2 tygodnie po zapłodnieniu)	Wylęg (odsetek i czas do wylęgu)	F1, F2
Osobnik młody (4 tygodnie po zapłodnieniu)	Przeżywalność	F1
Osobnik nie w pełni dojrzały (9 lub 10 tygodni po zapłodnieniu)	Przeżywalność	F1
	Wzrost (długość i masa)	

▼M8

Etap życia	Punkt końcowy	Pokolenie
	Witellogenina (mRNA lub białko)	
	Drugorzędowe cechy płciowe (brodawki płetwy odbytowej)	
	Proporcje płci w ujęciu zewnętrznym	
	Czas do pierwszego tarła	
Osobnik dorosły (12–14 tygodni po zapłodnieniu)	Rozrodczość (potencjał reprodukcyjny i płodność)	F0, F1
Osobnik dorosły (15 tygodni po zapłodnieniu)	Przeżywalność	F1
	Wzrost (długość i masa)	
	Drugorzędowe cechy płciowe (brodawki płetwy odbytowej)	
	Histopatologia (gonady, wątroba, nerki)	

(*) Te punkty końcowe należy poddać analizie statystycznej.

HARMONOGRAM

51. Badanie przedstawiono w harmonogramie badania MEOGRT w tabeli 2. Badanie MEOGRT obejmuje 4 tygodnie narażenia osobników dorosłych z pokolenia F0 i 15 tygodni narażenia pokolenia F1, jak również okres narażenia drugiego pokolenia (F2) aż do wylęgu (2 tygodnie po zapłodnieniu). Czynności podejmowane w ramach badania MEOGRT podsumowano w dodatku 9.

Tabela 2

Harmonogramy narażenia i pomiaru punktów końcowych w badaniu MEOGRT

Harmonogram narażenia i punktów końcowych w badaniu MEOGRT

Pokolenie F0	1	2	3	4															
Pokolenie F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Pokolenie F2																		1	2
Tydzień	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Etap życia Legenda					**Zarodek**					**Larwa**					**Osobnik młody**			**Osobnik nie w pełni dojrzały**	**Osobnik dorosły**
Punkty końcowe																			
Potencjał reprodukcyjny	F_0														F_1				
Płodność	F_0														F_1				
Wylęg					F_1														F_2
Przeżywalność						F_1						F_1						F_1	
Wzrost				F_0								F_1						F_1	
Witellogenina												F_1							
Drugorzędne cechy płciowe												F_1						F_1	
Histopatologia																		F_1	
Tydzień badania	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Schemat doświadczalny składa się z 7 grup kontrprób:
  - 5 wykorzystuje się w ramach zabiegów z użyciem badanej substancji chemicznej
  - 2 wykorzystuje się w próbie kontrolnej poddanej zabiegowi (4, jeżeli stosuje się rozpuszczalnik)
- Schemat w ramach grupy
  - 12 kontrprób wykorzystuje się do rozmnażania, patologii osobnika dorosłego i SSC (10–18 tydz.)
  - 6 kontrprób wykorzystuje się do badania wylęgu, przeżywalności, Vtg; oraz – SSC i wzrostu osobników nie w pełni dojrzałych (1–9 tydz.)

SSC: drugorzędne cechy płciowe; Tydz.: tygodnie;

Vtg: witellogenina

▼M8

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Analiza statystyczna

52. Ponieważ płeć genetyczną określa się w odniesieniu do wszystkich badanych ryb, dane należy analizować oddzielnie dla każdej płci genetycznej (tj. w odniesieniu do samców posiadających chromosomy XY i samic posiadających chromosomy XX). Niezastosowanie się do tych zasad znacznie zmniejszy moc statystyczną każdej analizy. Statystyczne analizy danych najlepiej jest wykonywać zgodnie z procedurami opisanymi w dokumencie OECD „Aktualne podejście do statystycznej analizy danych ekotoksyczności: wytyczne stosowania" (Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application) (32). Dodatek 10 zawiera dalsze wytyczne dotyczące analizy statystycznej.

53. W przypadku gdy należy zarejestrować NOEC, projekt badania i wybrany test statystyczny powinny zapewnić moc wystarczającą do wykrycia zmian o znaczeniu biologicznym w punktach końcowych (32). Zgłoszenie odpowiednich stężeń i parametrów efektywnych może zależeć od ram regulacyjnych. Należy wskazać procentową zmianę w każdym punkcie końcowym, który jest ważny pod względem wykrycia lub oszacowania. Schemat doświadczalny należy dostosować w taki sposób, aby było to możliwe. Istnieje małe prawdopodobieństwo, aby do wszystkich punktów końcowych miała zastosowanie taka sama zmiana procentowa, i równie mało prawdopodobne jest, aby można było zaplanować wykonalne doświadczenie spełniające te kryteria dla wszystkich punktów końcowych, w związku z tym należy skupić się na tych punktach końcowych, które są istotne dla danego doświadczenia, planując doświadczenie w odpowiedni sposób. W dodatku 10 dostępne są schematy statystyczne i wytyczne stanowiące pomoc w opracowywaniu danych oraz wyborze najodpowiedniejszego badania statystycznego lub modelu do wykorzystania. Można również zastosować inne podejścia statystyczne, pod warunkiem że są one uzasadnione z naukowego punktu widzenia.

54. Konieczna będzie analiza zmian w obrębie każdego zbioru kontrprób z zastosowaniem analizy wariancji lub procedur tablicy wielodzielczej oraz wystarczających, odpowiednich metod analizy statystycznej opartych na tej analizie. W odniesieniu do reakcji ciągłych, aby wielokrotnie porównać wyniki uzyskane przy poszczególnych stężeniach z wynikami prób kontrolnych, zaleca się stosowanie procedury regresyjnej (np. testu Jonckheere'a-Terpstry). Test Dunnetta lub Dunna należy stosować tam, gdzie dane nie są spójne z monotoniczną zależnością stężenie-odpowiedź (w razie potrzeby po odpowiedniej transformacji danych).

55. W kontekście potencjału reprodukcyjnego zliczenie jaj odbywa się codziennie, jednak można je analizować jako całkowite zliczenie jaj lub jako powtarzany pomiar. Informacje szczegółowe dotyczące analizy tego punktu końcowego znajdują się w dodatku 10. W odniesieniu do danych histopatologicznych przedstawionych w formie stopni nasilenia opracowano nowy test statystyczny o nazwie *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS)* (33).

56. Należy zgłosić wszelkie punkty końcowe zaobserwowane w zabiegach poddawania działaniu substancji chemicznych, które znacznie różnią się od właściwych prób kontrolnych.

Warunki analizy danych

Wykorzystanie zakłóconych poziomów zabiegu

57. Przy ustalaniu, czy kontrpróba lub cały zabieg wykazują wyraźną toksyczność i powinny zostać usunięte z analizy, należy uwzględnić kilka czynników. Widoczną toksyczność definiuje się jako śmiertelność wynoszącą > 4 w dowolnej kontrpróbie między 3 a 9 tygodniem po zapłodnieniu, której nie można wytłumaczyć błędem technicznym. Inne oznaki wyraźnej toksyczności to krwotok, nietypowe zachowania, nietypowe wzorce pływania, brak łaknienia i wszelkie inne kliniczne objawy choroby. W przypadku

▼M8

subletalnych objawów toksyczności niezbędne mogą być oceny jakościowe, które należy przeprowadzać zawsze w odniesieniu do grupy kontrolnej z wodą rozcieńczającą (należy stosować wyłącznie czystą wodę). Jeżeli widoczna toksyczność jest ewidentna w najwyższym zabiegu lub zabiegach, zaleca się odcięcie ich od analizy.

Kontrole z rozpuszczalnikiem

58. Użycie rozpuszczalnika należy brać pod uwagę tylko w ostateczności, po uwzględnieniu wszystkich innych opcji wprowadzenia substancji chemicznej. W przypadku zastosowania rozpuszczalnika należy jednocześnie wykonać próbę kontrolną z wodą rozcieńczającą. Na zakończenie badania należy przeprowadzić ocenę potencjalnego wpływu rozpuszczalnika. Dokonuje się tego, porównując statystycznie grupę kontrolną z rozpuszczalnikiem i grupę kontrolną z wodą rozcieńczającą. Najbardziej właściwe punkty końcowe, które należy uwzględnić w niniejszej analizie, to wyznaczniki wzrostu (masa), ponieważ mogą na nie wpłynąć toksyczności ogólne. Jeżeli w tych punktach końcowych wykryte zostaną statystycznie istotne różnice między grupą kontrolną z wodą rozcieńczającą a grupami kontrolnymi z rozpuszczalnikiem, należy odwołać się do swojej najlepszej wiedzy fachowej, aby ustalić, czy stanowią one zagrożenie dla ważności badania. Jeżeli dwie próby kontrolne różnią się od siebie, próby poddawane działaniu substancji chemicznej należy porównać z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem, chyba że wiadomo, że najlepiej jest przeprowadzić porównanie z próbą kontrolną z wodą rozcieńczającą. Jeżeli między dwiema grupami kontrolnymi nie występuje statystycznie istotna różnica, zaleca się porównanie zabiegów, w ramach których zwierzęta poddaje się działaniu substancji chemicznej, z pulą zabiegową (grupami kontrolnymi z rozpuszczalnikiem i z wodą rozcieńczającą), chyba że wiadomo, że najlepiej jest dokonać porównania z próbą kontrolną z wodą rozcieńczającą albo z rozpuszczalnikiem.

Sprawozdanie z badania

59. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna: właściwości fizyczne i – w stosownych przypadkach – właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej.

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp. (w tym, w stosownych przypadkach, zawartość węgla organicznego).

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

— opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), występowania ilościowego oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Badany gatunek:

— nazwa systematyczna, szczep (jeżeli jest dostępny), źródło i metoda pobierania zapłodnionych jaj i dalsze postępowanie.

Warunki badania:

— fotoperiod(-y);

— projekt badania (np. rozmiar komory, objętość materiału i wody, liczba komór badawczych oraz kontrprób, liczba osobników w wylęgu na kontrpróbę);

▼M8

— metoda przygotowania roztworów podstawowych i częstotliwość wymiany (jeżeli zastosowany został środek rozpuszczający, należy podać jego stężenie);

— metoda dawkowania badanej substancji chemicznej (np. pompy, układy rozcieńczające);

— wydajność odzyskowa metody i badane stężenia nominalne, granica oznaczalności, średnie wartości pomiarowych oraz ich odchylenia standardowe w naczyniach badawczych, a także metoda uzyskania takich wartości oraz dowody świadczące o tym, że pomiary odnoszą się do stężeń badanej substancji chemicznej w rzeczywistym roztworze;

— charakterystyka wody rozcieńczającej: pH, twardość, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom chloru resztkowego (jeśli dokonano pomiaru), całkowity węgiel organiczny (jeśli dokonano pomiaru), zawiesina (jeśli dokonano pomiaru), zasolenie środowiska badania (jeśli dokonano pomiaru) oraz wszelkie inne wykonane pomiary;

— badane stężenia nominalne, średnie wartości pomiarowych oraz ich odchylenia standardowe;

— jakość wody w naczyniach badawczych, pH, temperatura (codziennie) i stężenie rozpuszczonego tlenu;

— szczegółowe informacje dotyczące karmienia (np. rodzaj pokarmu, jego źródło, podawana ilość i częstotliwość podawania).

Wyniki:

— dowody świadczące o tym, że próby kontrolne spełniają ogólne kryteria ważności;

— dane dotyczące próby kontrolnej (oraz próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem, jeżeli jest stosowana) oraz grup poddanych zabiegowi, takie jak: wylęg (wylęgowość oraz czasu wylęgu) w pokoleniach F1 i F2, przeżywalność po wylęgu w pokoleniu F1, wzrost (długość i masa ciała) w pokoleniu F1, płeć genetyczna oraz zróżnicowanie płci (np. drugorzędowe cechy płciowe na podstawie brodawek płetwy odbytowej i histologii gonad) w pokoleniu F1, płeć fenotypowa w pokoleniu F1, drugorzędowe cechy płciowe (brodawki płetwy odbytowej) w pokoleniu F1, mRNA *vtg* (lub białko VTG) w pokoleniu F1, ocena histopatologiczna (gonady, wątroba i nerki) w pokoleniu F1 oraz rozrodczość (potencjał reprodukcyjny i płodność) w pokoleniach F0 i F1; (zob. tabele 1 i 2);

— metoda analizy statystycznej (analiza regresji lub analiza wariancji) oraz przetwarzania danych (zastosowane badania lub modele statystyczne);

— stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) w odniesieniu do każdej ocenionej reakcji;

— najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), w odniesieniu do każdej ocenionej reakcji (przy $p = 0,05$); EC_x w odniesieniu do każdej ocenianej reakcji, jeżeli dotyczy, i przedziały ufności (np. 90 % lub 95 %) oraz wykres dopasowanego modelu wykorzystanego do obliczeń, nachylenie krzywej zależności stężenie-odpowiedź, wzór modelu regresji, szacowane parametry modelu i ich błędy standardowe;

— wszelkie odchylenia od niniejszej metody badawczej oraz odchylenia od kryteriów dopuszczalności, a także rozważania dotyczące potencjalnych konsekwencji wyniku badania.

▼M8

60. W odniesieniu do wyników pomiarów punktów końcowych należy przedstawić średnie wartości oraz ich odchylenia standardowe (w miarę możliwości zarówno na podstawie kontrprób, jak i stężeń).

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2012a). *Fish Toxicity Testing Framework.* Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 171, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K i 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. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 150, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(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 i 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 i 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 i 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 i 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 i 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 i 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 i 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) Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Dostępne na stronie internetowej: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P i 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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 23, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ i 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 i Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ i 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 i Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K i 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) Rozdział C.15 niniejszego załączika, Ryby, krótkoterminowe badanie toksyczności na embrionie i narybku.

(22) Rozdział C.37 niniejszego załącznika, 21-dniowe badanie ryb: krótkoterminowe badanie przesiewowe aktywności estrogennej i androgennej oraz zahamowanie aromatazy.

(23) Rozdział C.41 niniejszego załącznika, Badanie rozwoju płciowego ryb.

(24) Rozdział C.48 niniejszego załącznika, Krótkoterminowe badanie rozrodczości ryb.

(25) Rozdział C.47 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności na wczesnych etapach życia ryb.

(26) Rozdział C.49 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności ostrej na rybich embrionach (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L i Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Viv*o Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M i 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, Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 227. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M i 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 i 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 (załączniki do tej publikacji stanowią osobny dokument). Paryż: OECD Publishing.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN i Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

▼**M8**

Dodatek 1

DEFINICJE

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

ELISA: test immunoenzymatyczny.

Potencjał reprodukcyjny = liczba jaj.

Płodność = liczba żywotnych jaj / potencjał reprodukcyjny.

Długość ogonowa (FL) oznacza długość od czubka otworu gębowego do końca środkowego promienia płetwy ogonowej – parametr ten wykorzystuje się w odniesieniu do ryb, u których trudno jest wskazać miejsce, w którym kończy się kręgosłup (www.fishbase.org).

Wylęgowość = wylęgi / liczba zarodków załadowanych do inkubatora.

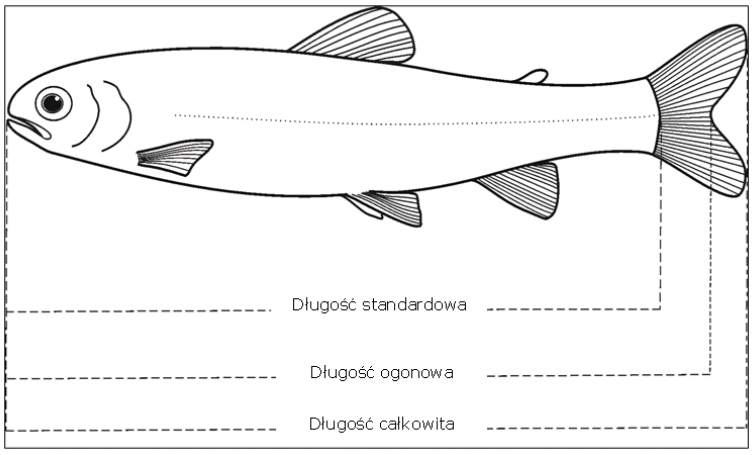
IACUC: Komitet Instytucjonalny ds. Opieki i Wykorzystania Zwierząt (ang. Institutional Animal Care and Use Committee).

Długość standardowa (SL) oznacza długość ryby mierzoną od czubka otworu gębowego do tylnej krawędzi ostatniego kręgu lub do tylnej krawędzi środkowobocznej części urostylu. Innymi słowy, w ramach tego pomiaru nie bierze się pod uwagę długości płetwy ogonowej (www.fishbase.org).

Długość całkowita (TL) oznacza długość mierzoną od czubka otworu gębowego do czubka dłuższego płata płetwy ogonowej, zazwyczaj mierzonego po zgięciu płatów do linii środkowej. Pomiar zdejmuje się wzdłuż linii prostej, nie wzdłuż krzywizny ciała ryby (www.fishbase.org).

Rys. 1

Opis różnych stosowanych długości



EC_x: (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływ na organizmy użyte do badań w danym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną. Na przykład EC_{50} jest stężeniem, które według szacunków ma wpływ na punkt końcowy badania w 50 % narażonej populacji w określonym okresie narażenia.

Badanie przepływowe to badanie, w którym podczas narażenia trwa ciągły przepływ roztworów do badań przez układ badawczy.

Oś HPG: oś podwzgórze–przysadka–gonady.

▼M8

IUPAC: Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej.

Wskaźnik obciążenia: mokra masa ryb na objętość wody.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC): najmniejsze badane stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym obserwuje się znaczące działanie toksyczne (przy $p < 0,05$) w porównaniu z próba kontrolną. Wszystkie badane stężenia powyżej LOEC powinny jednak wywierać szkodliwy skutek równy skutkom, które zaobserwowano przy LOEC, lub od nich większy. W przypadku gdy oba warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC). W dodatkach 5 i 6 przedstawiono wytyczne w tym zakresie.

Mediana stężenia śmiertelnego (LC_{50}): stężenie badanej substancji chemicznej szacowane jako stężenie śmiertelne dla 50 % organizmów użytych do badań podczas trwania badania.

Stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC): badane stężenie bezpośrednio poniżej LOEC, które nie wywiera statystycznie istotnego wpływu ($p < 0,05$) w ustalonym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną.

SMILES (ang. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*): uproszczony sposób zapisu struktury chemicznej w liniowej formie tekstowej.

Obsada: liczba ryb na objętość wody.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

VTG: witellogenina to fosfolipidoglikoproteinowy prekursor białek żółtka jajka występujący zwykle u aktywnych płciowo samic wszystkich gatunków jajorodnych.

TPZ: tygodnie po zapłodnieniu.

▼**M8**

Dodatek 2

NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE DOPUSZCZALNEJ WODY ROZCIEŃCZAJĄCEJ

Substancja	Stężenie graniczne
Cząstki stałe	5 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	2 mg/l
Amoniak niejonizowany	1 µg/l
Chlor resztkowy	10 µg/l
Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych	50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli	50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	25 ng/l
Glin	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Miedź	1 µg/l
Żelazo	1 µg/l
Ołów	1 µg/l
Nikiel	1 µg/l
Cynk	1 µg/l
Kadm	100 ng/l
Rtęć	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

▼**M8**

Dodatek 3

WARUNKI BADANIA WŁAŚCIWE DLA BADANIA MEOGRT

1. Zalecany gatunek	Ryżanka japońska (*Oryzias latipes*)
2. Rodzaj badania	W warunkach ciągłego przepływu
3. Temperatura wody	Nominalna temperatura badania wynosi 25 °C. Średnia temperatura w trakcie badania w każdym zbiorniku wynosi 24–26 °C.
4. Jakość oświetlenia	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum oraz o mocy ~150 lumenów/m^2) (~150 luksów).
5. Fotoperiod	16 godzin światła, 8 godzin ciemności.
6. Wskaźnik obciążenia	Pokolenie F0: 2 osobniki dorosłe na kontrpróbę; pokolenie F1: początkowo przy wykorzystaniu maksymalnie 20 jaj (zarodków) na kontrpróbę, przy wylęgu zmniejszenie do 12 zarodków na kontrpróbę, a następnie w 9–10 tygodniu po zapłodnieniu 2 osobniki dorosłe (para hodowlana o zestawie chromosomów XX–XY) na potrzeby etapu rozmnażania.
7. Minimalna objętość użytkowa komory badawczej	1,8 l (np. wielkość komory badawczej: 18 x 9 x 15 cm).
8. Wymiana objętości roztworów do badań	Minimum 5 wymian objętości dziennie do 16 wymian objętości dziennie (lub przy natężeniu przepływu wynoszącym 20 ml/min).
9. Początkowy wiek organizmów użytych do badań	Pokolenie F0: >12 tygodni po zapłodnieniu, zaleca się jednak nie przekraczać 16 tygodnia po zapłodnieniu.
10. Liczba organizmów na kontrpróbę	Pokolenie F0: 2 ryby (para samiec – samica) pokolenie F1: maksymalnie 20 ryb (jaj) na kontrpróbę (pochodzących od par hodowlanych z pokoleń F0 oraz F1).
11. Liczba zabiegów	5 zabiegów z użyciem badanej substancji chemicznej oraz odpowiednie próby kontrolne.
12. Liczba kontrprób na zabieg	Minimum 6 kontrprób na zabieg w odniesieniu do badanej substancji chemicznej oraz minimum 12 kontrprób w odniesieniu do próby kontrolnej i próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem (liczbę kontrprób podwaja się na etapie rozmnażania w pokoleniu F1), jeżeli je zastosowano.
13. Liczba organizmów na badanie	Minimum 84 ryby w przypadku pokolenia F0 i 504 ryby w przypadku pokolenia F1. (Jeżeli zastosowano próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem – minimum 108 ryb w przypadku pokolenia F0 i 648 ryb w przypadku pokolenia F1). Liczoną jednostką są osobniki, które zakończyły stadium rozwoju na etapie eleuteroembrionu.
14. Schemat żywienia	Ryby karmi się bez ograniczeń solowcami z gatunku *Artemia* spp., (24-godzinnymi larwami), dokarmiając w razie potrzeby dostępnym na rynku pokarmem w płatkach (w dodatku 5 można znaleźć przykładowy schemat żywienia zapewniający odpowiedni wzrost i rozwój wspomagające wysoką rozrodczość).

▼**M8**

15. Napowietrzanie	Bez napowietrzania, dopóki zawartość tlenu rozpuszczonego nie zbliża się do < 60 % wartości nasycenia powietrzem.
16. Woda rozcieńczająca	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana, lub odchlorowana woda wodociągowa.
17. Okres narażenia	Zasadniczo 19 tygodni (od pokolenia F0 do wylęgu pokolenia F2).
18. Biologiczne punkty końcowe (pierwotne)	Wylęgowość (pokolenia F1 i F2); przeżywalność (pokolenie F1, od wylęgu do 4 tygodnia po zapłodnieniu (koniec stadium larwalnego / początek stadium młodocianego), od 4 do 9 (lub 10) tygodnia po zapłodnieniu (początek stadium młodocianego do stadium niepełnej dojrzałości) oraz od 9 do 15 tygodnia po zapłodnieniu (od stadium niepełnej dojrzałości do eutanazji osobników dorosłych)); wzrost (pokolenie F1, długość i masa w 9 i 15 tygodniu po zapłodnieniu); drugorzędowe cechy płciowe (pokolenie F1, brodawki płetwy odbytowej w 9 i 15 tygodniu po zapłodnieniu); witellogenina (pokolenie F1, mRNA *vtg* lub białko VTG w 15 tygodniu po zapłodnieniu); płeć fenotypowa (pokolenie F1, poprzez histologię gonady w 15 tygodniu po zapłodnieniu); rozrodczość (pokolenia F0 i F1, potencjał reprodukcyjny i płodność przez 21 dni); czas do tarła (pokolenie F1); oraz histopatologia (pokolenie F1, gonada, wątroba i nerka w 15 tygodniu po zapłodnieniu).
19. Kryteria ważności badania	Rozpuszczony tlen zapewniający wartość nasycenia powietrzem wynoszącą ≥ 60 %; średnia temperatura wody w trakcie badania: 24–26 °C; pomyślne rozmnożenie ≥ 65 % samic w próbach kontrolnych; średni dzienny potencjał reprodukcyjny ≥ 20 jaj w próbach kontrolnych; wylęgowość jaj powinna wynosić (średnio) ≥ 80 % w próbach kontrolnych (w każdej z pokolenia F1 i F2); przeżywalność po wylęgu do 3 tygodni po zapłodnieniu na poziomie (średnio) ≥ 80 % i od 3 tygodni po zapłodnieniu do uśmiercenia (średnio) ≥ 90 % w odniesieniu do pokolenia w próbach kontrolnych (pokolenie F1) – stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze powinny być utrzymywane w sposób zadowalający w zakresie ± 20 % średnich zmierzonych wartości.

▼M8

Dodatek 4

WYTYCZNE DOTYCZĄCE TYPOWYCH WARTOŚCI KONTROLNYCH

Należy zauważyć, że niniejsze wartości kontrolne opierają się na ograniczonej liczbie badań walidacyjnych i mogą ulec zmianie w świetle dalszych doświadczeń.

Wzrost

Pomiary masy i długości pobierane są dla wszystkich ryb, z których pobrano próbki między 9. (lub 10.) a 15. tygodniem po zapłodnieniu. Zgodnie z tą procedurą spodziewana mokra masa w 9. tygodniu po zapłodnieniu w przypadku samców wyniesie 85–145 mg, a w przypadku samic – 95–150 mg. W 15. tygodniu po zapłodnieniu spodziewane masy to 250–330 mg w przypadku samców oraz 280–350 mg w przypadku samic. Chociaż w przypadku poszczególnych ryb mogą zaistnieć znaczne odchylenia od tych zakresów, średnie masy w próbie kontrolnej znacznie wychodzące poza te wartości, zwłaszcza jeżeli są od nich niższe, mogą wskazywać na problemy z żywieniem, kontrolą temperatury, jakością wody, chorobę lub dowolną kombinację niniejszych czynników.

Wylęg

Skuteczność wylęgu w próbach kontrolnych zazwyczaj oscyluje w graniach 90 %, jednak niskie wartości na poziomie 80 % nie są rzadkością. Skuteczność wylęgu poniżej 75 % może wskazywać na niewystarczające wymieszanie rozwijających się jaj lub niedostateczną ostrożność w obchodzeniu się z nimi, np. nieterminowe usuwanie martwych jaj prowadzące do zakażenia grzybiczego.

Przeżywalność

Wskaźniki przeżycia do 3. tygodnia po zapłodnieniu od wylęgu oraz po 3 tygodniach po zapłodnieniu zazwyczaj wynoszą przynajmniej 90 % w odniesieniu do prób kontrolnych, niskie wskaźniki przeżywalności na poziomie 80 % we wczesnym stadium rozwoju w odniesieniu do prób kontrolnych nie są jednak niepokojące. Wskaźniki przeżywalności w próbach kontrolnych poniżej 80 % mogłyby być powodem do obaw i wskazywać na niedostateczną dbałość o czystość akwariów, mogącą prowadzić do utraty ryb w fazie larwalnej w wyniku choroby lub uduszenia z powodu niskiego poziomu stężenia rozpuszczonego tlenu. Śmiertelność może być także wynikiem uszkodzenia w trakcie czyszczenia zbiornika oraz utraty ryb w fazie larwalnej w systemie odprowadzania wody ze zbiornika.

Gen witellogeniny

Chociaż bezwzględne poziomy genu witellogeniny (*vtg*), wyrażone w kopiach/ng całkowitego mRNA, mogą znacznie różnić się między laboratoriami z powodu stosowanych procedur lub oprzyrządowania, stosunek *vtg* samic w próbie kontrolnej do samców w próbie kontrolnej powinien być około 200 razy większy. Nie jest rzadkością, że dany stosunek osiąga wartość nawet od 1 000 do 2 000, jednak stosunki poniżej 200 są podejrzane i mogą wskazywać na problemy z zanieczyszczeniem próbki lub problemy dotyczące procedury lub zastosowanych odczynników.

Drugorzędowe cechy płciowe

Jeżeli chodzi o samców, zwyczajowy zakres drugorzędowych cech płciowych, który określany jest jako całkowita liczba segmentów w promieniach brodawki płetwy odbytowej, wynosi 40–80 segmentów w 9.–10. tygodniu po zapłodnieniu. Do 15. tygodnia po zapłodnieniu, zakres dotyczący samców w próbie kontrolnej powinien oscylować w granicach 80–120, a w przypadku samic w próbie kontrolnej wartość powinna wynosić około 0. W rzadkich przypadkach, z niewyjaśnionych powodów niektóre samce w 9. tygodniu po zapłodnieniu mogą mieć niewykształcone brodawki, ale ponieważ rozwój brodawek u wszystkich samców w próbie kontrolnej następuje do 15. tygodnia po zapłodnieniu, jest to najprawdopodobniej spowodowane opóźnionym rozwojem. Obecność brodawek u samic w próbie kontrolnej wskazuje na obecność samców XX w populacji.

▼**M8**

Samce XX

Zwykle podstawowa częstość występowania samców XX w hodowli w temperaturze 25 °C wydaje się wynosić około 4 % lub mniej, a częstość występowania zwiększa się wraz z temperaturą. Należy podjąć działania mające na celu zminimalizowanie odsetka samców XX w populacji. Ponieważ częstość występowania samców XX wydaje się posiadać element genetyczny i w związku z tym jest dziedziczna, monitorowanie kultury wyjściowej oraz zapewnianie, aby samce XX nie były wykorzystywane do jej rozmnażania, jest skutecznym sposobem ograniczania częstości występowania samców XX w populacji.

Aktywność tarła

Aktywność tarła w kontrpróbach kontrolnych należy monitorować codziennie przed przeprowadzeniem oceny potencjału reprodukcyjnego. Pary w próbie kontrolnej można poddać ocenie jakościowej w sposób wizualny pod względem dowodów na aktywność tarła. Większość par w próbie kontrolnej powinna składać jaja między 12. a 14. tygodniem po zapłodnieniu. Niska liczba par składających jaja do tego czasu wskazuje na potencjalne problemy ze zdrowiem, dojrzałością lub dobrostanem ryb.

Potencjał reprodukcyjny

Zdrowa i dobrze odżywiana przez 12–14 tygodni po zapłodnieniu ryżanka japońska zazwyczaj składa jaja codziennie, wytwarzając w ciągu dnia 15–50 jaj. Wytwarzanie jaj w przypadku 16 z zalecanych 24 par hodowlanych w próbie kontrolnej (> 65 %) powinno dawać więcej niż 20 jaj na parę dziennie i może sięgać nawet około 40 jaj dziennie. Wartość niższa niż ta może wskazywać na niedojrzałe, niedożywione lub niezdrowe pary tarłowe.

Płodność

Odsetek płodnych jaj w odniesieniu do par tarłowych w próbie kontrolnej mieści się zazwyczaj w zakresie 90 %, przy czym wartości w okolicach 95 % i wyższe nie są rzadkością. Współczynniki płodności wynoszące poniżej 80 % w odniesieniu do jaj w próbie kontrolnej są podejrzane i mogą wskazywać albo na niezdrowe osobniki, albo na warunki hodowli gorsze od idealnych.

▼M8

Dodatek 5

PRZYKŁADOWY SCHEMAT ŻYWIENIA

W tabeli 1 przedstawiono przykładowy schemat żywienia zapewniający odpowiedni wzrost i rozwój w celu wsparcia intensywnego rozmnażania. Odchylenia od tego schematu żywienia są dopuszczalne, jednak zaleca się zbadanie ich w celu sprawdzenia, czy można zaobserwować akceptowalny rozwój i rozmnażanie. Postępowanie zgodnie z proponowanym schematem żywienia wymaga określenia suchej masy solowca w objętości mułu zawierającego solowiec przed rozpoczęciem badania. Można tego dokonać, odważając określoną objętość mułu zawierającego solowiec, który suszono przez 24 godziny w temperaturze 60 °C na zważonej wcześniej szalce. Aby uwzględnić masę soli w mule, identyczną objętość takiego samego roztworu soli jak ten wykorzystywany w mule należy również wysuszyć, zważyć i odjąć od masy wysuszonego mułu zawierającego solowiec. Przed wysuszeniem można ewentualnie przefiltrować i wypłukać solowce wodą destylowaną, eliminując dzięki temu potrzebę ważenia „czystej soli”. Informacje te wykorzystuje się do przeliczenia informacji zawartych w tabeli z suchej masy solowca do objętości mułu zawierającego solowiec, jaką należy karmić każdą rybę. Zaleca się ponadto cotygodniowe ważenie podwielokrotności mułu zawierającego solowiec w celu sprawdzenia prawidłowej suchej masy podawanego solowca.

Tabela 1

Przykładowy schemat żywienia

Czas (po wylęgu)	Solowiec (mg suchej masy na rybę na dzień)
Dzień 1	0,5
Dzień 2	0,5
Dzień 3	0,6
Dzień 4	0,7
Dzień 5	0,8
Dzień 6	1,0
Dzień 7	1,3
Dzień 8	1,7
Dzień 9	2,2
Dzień 10	2,8
Dzień 11	3,5
Dzień 12	4,2
Dzień 13	4,5
Dzień 14	4,8
Dzień 15	5,2
Dni 16–21	5,6

▼**M8**

Czas (po wylęgu)	Solowiec (mg suchej masy na rybę na dzień)
Tydzień 4	7,7
Tydzień 5	9,0
Tydzień 6	11,0
Tydzień 7	13,5
Tydzień 8 – uśmiercenie	22,5

▼**M8**

Dodatek 6

PRZYKŁADY KOMORY INKUBACYJNEJ JAJ

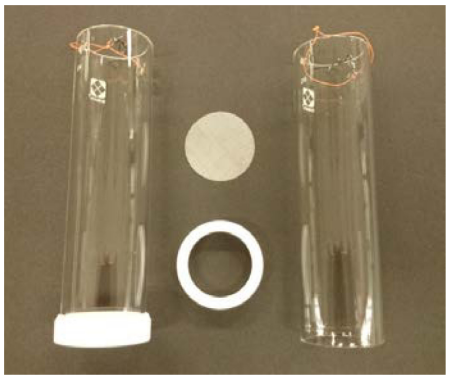
Przykład B





Inkubator ten składa się z probówki do wirówki z przezroczystego szkła, połączonej tuleją ze stali nierdzewnej i utrzymywanej w miejscu przez górną pokrywę śruby wirówki. Mała rurka ze szkła lub stali nierdzewnej wystaje poza pokrywę i jest umieszczona blisko zaokrąglonego dna, delikatnie przepuszczając powietrze, by podtrzymać jaja i ograniczyć przenoszenie się między jajami zakażeń saprofitami, ułatwiając jednocześnie wymianę chemiczną między inkubatorem a zbiornikiem.

Przykład B



▼**M8**



Inkubator ten składa się ze szklanego, cylindrycznego korpusu (o średnicy 5 cm i wysokości 10 cm) i nierdzewnej siatki drucianej (0,25 φ, oczko siatki – 32), która jest przymocowana do spodu korpusu za pomocą pierścienia PTFE. Inkubatory mocuje się do zbiorników na prowadnicy i potrząsa pionowo (w amplitudzie około 5 cm) w odpowiednim cyklu (około raz na 4 sekundy) dla jaj ryżanki japońskiej.

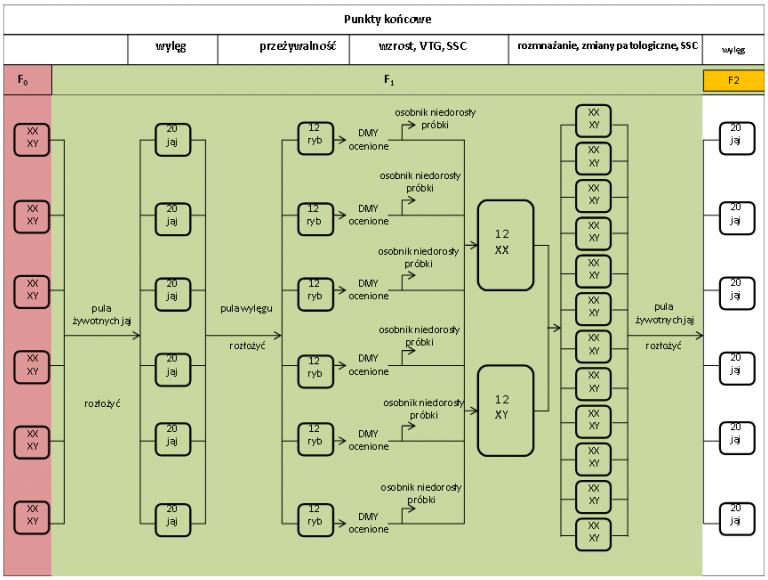
▼M8

Dodatek 7

SCHEMAT PRZEDSTAWIAJĄCY ŁĄCZENIE I ROZPRZESTRZENIANIE KONTRPRÓB METODĄ BADAWCZĄ MEOGRT

Rys. 1

Łączenie i rozprzestrzenianie kontrprób metodą badawczą MEOGRT. Rysunek przedstawia jeden zabieg lub ½ próby kontrolnej. Z powodu połączenia, w trakcie badania tożsamość kontrpróby nie jest ciągła. Należy zauważyć, że pojęcie „jaja" odnosi się do żywotnych, zapłodnionych jaj (równoważnych z zarodkami).



Zabiegi i opracowywanie kontrprób

Na podstawie metody badawczej zaleca się, aby w pięciu zabiegach z użyciem badanej substancji chemicznej wykorzystano materiał czysty technicznie oraz próbę kontrolną ujemną. Liczba kontrprób na zabieg w trakcie MEOGRT jest zmienna, a liczba kontrprób w grupie kontrolnej stanowi dwukrotność każdego zabiegu z użyciem badanej substancji chemicznej. W pokoleniu F0 każdy zabieg z użyciem badanej substancji chemicznej obejmuje sześć kontrprób, natomiast zabieg w próbie kontrolnej ujemnej obejmuje 12 kontrprób. Zdecydowanie odradza się wykorzystywania rozpuszczalników, a w razie ich użycia, w sprawozdaniu MEOGRT należy zawrzeć uzasadnienie dotyczące zastosowania oraz wyboru rozpuszczalnika. Jeżeli wykorzystuje się rozpuszczalnik, konieczne są również dwa rodzaje prób kontrolnych: a) kontrola z rozpuszczalnikiem, oraz b) kontrolna ujemna. Każda z tych dwóch grup kontrolnych powinna zawierać pełny zestaw kontrprób we wszystkich punktach harmonogramu MEOGRT. Ta struktura kontrprób pozostaje niezmieniona w całym okresie rozwoju organizmów użytych do badań w pokoleniu F1 (oraz pokoleniu F2, do momentu wylęgu). W stadium dorosłym, podczas ustanawiania par hodowlanych w pokoleniu F1, liczba kontrprób z parami hodowlanymi na zabieg powinna optymalnie zostać podwojona; dlatego istnieje do 12 par kontrprób w każdym zabiegu z użyciem badanej substancji chemicznej oraz 24 pary kontrprób w grupie kontrolnej (i w razie potrzeby kolejne 24 pary kontrprób w próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem). Określenia wylęgu zarodków pochodzących z tarła par z pokolenia F1 dokonuje się na podstawie takiej samej struktury kontrprób jak w przypadku zarodków pochodzących z tarła par z pokolenia F0, tzn. początkowo sześć kontrprób na zabieg z użyciem badanej substancji chemicznej i 12 kontrprób w grupie kontrolnej lub w grupach kontrolnych.

▼M8

Dodatek 8

ZLICZANIE BRODAWEK PŁETWY ODBYTOWEJ

Główne materiały i odczynniki

— Mikroskop stereoskopowy (z dołączoną opcjonalną kamerą)

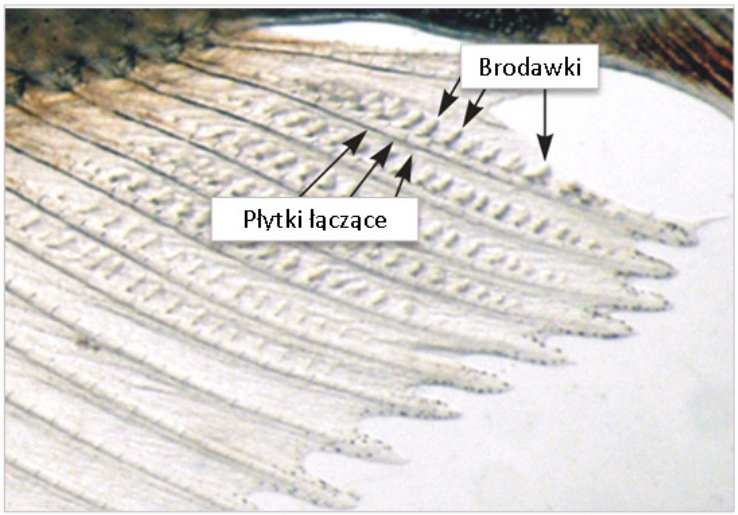
— Utrwalacz (np. utrwalacz Davidsona (nie zaleca się stosowania utrwalacza Bouina)), jeżeli nie prowadzi się zliczania na podstawie obrazowania

Procedury

Po autopsji należy zobrazować płetwę odbytową, aby umożliwić wygodne zliczanie jej brodawek. Chociaż zliczanie na podstawie obrazowania jest zalecaną metodą, płetwę odbytową można utrwalić stosując przez około minutę utrwalacz Davidsona lub inny odpowiedni utrwalacz. Istotne jest, aby w trakcie utrwalania płetwę odbytową trzymać w pozycji płaskiej, co ułatwi zliczanie brodawek. Ciała posiadające płetwę odbytową można do czasu analizy przechowywać w utrwalaczu Davidsona lub innym odpowiednim utrwalaczu. Należy zliczyć liczbę płytek łączących (zob. **rys. 1**) zawierających brodawki, które wystają z tylnego obrzeża płytki łączącej.

Rys. 1

Brodawki płetwy odbytowej



▼M8

Dodatek 9

SZCZEGÓŁOWY HARMONOGRAM BADANIA MEOGRT

Tygodnie badania 1–3 (F0)

Ryby w okresie tarła z pokolenia F0, które spełniły kryteria kwalifikacji (zob. pkt 16–20), aby umożliwić rozwój gamet i tkanek gonad, są przez trzy tygodnie narażane na działanie badanej substancji chemicznej. W każdym skopiowanym zbiorniku mieści się jedna para hodowlana ryb (para hodowlana samica XX – samiec XY). Przez 21 kolejnych dni, poczynając od 1. dnia badania, złożone jaja zbiera się, liczy i ocenia pod kątem płodności.

Tydzień badania 4 (pokolenia F0 i F1)

Najlepiej, jeżeli zapłodnione i żywotne jaja (zarodki) zbierze się jednego dnia; jeżeli jednak liczba zarodków jest niewystarczająca, należy je zebrać w ciągu dwóch dni. Jeżeli zbierze się je w ciągu dwóch dni, wszystkie zarodki w ramach zabiegu, które zebrano pierwszego dnia, są łączone z zarodkami zebranymi drugiego dnia. Następnie wszystkie połączone zarodki z każdego zabiegu losowo rozdziela się do każdego inkubatora kontrpróby po 20 zarodków na inkubator. Śmiertelność zapłodnionych jaj (zarodków) sprawdza się i odnotowuje codziennie. Martwe jaja usuwa się z inkubatorów (śmierć zapłodnionych jaj można wykryć, w szczególności we wczesnych stadiach, poprzez znaczącą utratę przezroczystości i zmianę zabarwienia spowodowaną koagulacją lub strącaniem białek, przez co jaja stają się białe i nieprzezroczyste; OECD (2010).

Uwaga: Jeżeli pojedynczy zabieg wymaga drugiego dnia zbiorów, wszystkie zabiegi (w tym próby kontrolne) należy poddać tej procedurze. W przypadku gdy po drugim dniu zbiorów liczba zarodków na zabieg jest niewystarczająca i nie pozwala na rozmieszczenie 20 zarodków na inkubator, należy wówczas zmniejszyć liczbę zarodków rozmieszczonych w ramach tego konkretnego zabiegu do 15 zarodków na inkubator. Jeżeli nie ma wystarczającej liczby zarodków, aby rozmieścić je po 15 na inkubator, należy wówczas zmniejszyć liczbę inkubatorów do takiej, przy której wystarczy zarodków do rozmieszczenia po 15 na inkubator. Ponadto w pokoleniu F0 można dodać więcej par hodowlanych na zabieg i próby kontrolne, aby wytworzyć więcej jaj i osiągnąć zalecane 20 jaj na kontrpróbę.

W 24. dniu badania pary hodowlane z pokolenia F0 uśmierca się w sposób humanitarny i odnotowuje się ich masę i długość. W razie potrzeby pary hodowlane z pokolenia F0 można utrzymać przez dodatkowe 1–2 dni, aby ponownie ustanowić pokolenie F1.

Tygodnie badania 5–6 (F1)

Dzień do dwóch dni przed przewidywanym rozpoczęciem wylęgu należy zaprzestać poruszania inkubowanymi jajami lub ograniczyć je, aby usprawnić wylęg. Z uwagi na fakt, że zarodki wykluwają się każdego dnia, narybek łączy się według zabiegu i systematycznie przenosi do każdego zbiornika zawierającego kontrpróbę z larwami w ramach konkretnego zabiegu i w ilości nie większej niż 12 osobników z wylęgu. Dokonuje się tego poprzez losowy wybór narybku i umieszczenie pojedynczych osobników w następujących po sobie kontrpróbach w losowym pobieraniu, przechodząc w ten sposób przez poszczególne kontrpróby poddane zabiegowi, aż do momentu, gdy wszystkie kontrpróby w ramach zabiegu będą miały zawierały 12 osobników z wylęgu. Jeżeli liczba osobników w wylęgu nie jest wystarczająca, by wypełnić wszystkie kontrpróby, należy wówczas dopilnować, aby jak najwięcej kontrprób posiadało 12 osobników z wylęgu w celu ustanowienia pokolenia F1.

Jaja, z których w czasie będącym dwukrotnością mediany dnia wylęgu w próbie kontrolnej nie wykluły się młode, uznaje się za niezdolne do życia i odrzuca. Liczbę osobników z wylęgu rejestruje się, a w każdej kontrpróbie wylicza się skuteczność wylęgu (wylęgowość).

▼M8

Tygodnie badania 7–11 (F1)

Przeżywalność ryb w fazie larwalnej w przypadku wszystkich kontrprób sprawdza się i odnotowuje codziennie. W 43. dniu badania odnotowuje się liczbę ryb, które przeżyły w każdej kontrpróbie, a także początkową liczbę narybku umieszczonego w kontrpróbie (nominalnie dwanaście). Pozwala to na obliczenie odsetka przeżywalności od wylęgu do stadium niepełnej dojrzałości.

Tydzień badania 12 (F1)

W dniach badania 78–85 pobiera się niewielką próbkę z płetwy ogonowej każdej ryby, aby określić płeć genetyczną osobnika (np. znakowanie przez obcinanie płetw) w odniesieniu do wszystkich ryb. Informacje te wykorzystywane są do ustanawiania par hodowlanych.

W ciągu trzech dni od określenia płci genetycznej, ustanawia się losowo 12 par hodowlanych na zabieg i 24 pary hodowlane na próbę kontrolną. Z każdej kontrpróby wybiera się losowo dwie ryby XX i dwie ryby XY i łączy według płci, a następnie ryby wybiera się losowo w celu ustanowienia pary hodowlanej (np. para XX-XY). Wykorzystując jedną parę hodowlaną na kontrpróbę, ustanawia się co najmniej 12 kontrprób na zabieg oraz 24 kontrpróby w odniesieniu do próby kontrolnej. Jeżeli kontrpróba nie zawiera dwóch ryb posiadających chromosomy XX albo XY, które można połączyć, wówczas z innych kontrprób w ramach zabiegu należy pozyskać rybę z odpowiednim genotypem płci.

Pozostałe ryby (maksimum 8 ryb na kontrpróbę) uśmierca się w sposób humanitarny i pobiera się z nich próbki pod kątem zbadania punktów końcowych osobników nie w pełni dojrzałych. Dane *dmy* (XX lub XY) dotyczące wszystkich próbek osobników nie w pełni dojrzałych zachowuje się w celu zapewnienia, aby wszystkie dane dotyczące punktów końcowych odnosiły się do płci genetycznej każdej pojedynczej ryby.

Tygodnie badania 13–14 (F1)

Narażenie kontynuuje się, gdy nie w pełni dojrzałe pary hodowlane przekształcają się w osobniki dorosłe. W 98. dniu badania (tj. w dniu przed rozpoczęciem zbierania jaj) jaja usuwa się zarówno z akwariów, jak i z samic.

Tygodnie badania 15–17 (F1)

Złożone jaja pobiera się codziennie prze 21 kolejnych dni w każdej próbie i ocenia pod względem potencjału reprodukcyjnego i płodności.

Tydzień badania 18 (powtórzenie tygodnia badania 4) (F1 i F2)

Rano 120. dnia badania jaja są zbierane z każdego zbiornika kontrpróby. Zebrane jaja poddaje się ocenie, a zapłodnione jaja (po usunięciu włókien) każdej pary hodowlanej są łączone według zabiegu i systematycznie rozdzielane do komór inkubacyjnych z jajami po 20 zapłodnionych jaj na inkubator. Inkubatory można umieścić w oddzielnych „zbiornikach inkubatorów" zakładanych dla każdego zabiegu lub w zbiorniku z kontrpróbą, w którym po wylęgu znajdą się wyklute larwy. Najlepiej zbierać zarodki jednego dnia; jeżeli jednak nie ma wystarczającej liczby zarodków, można je zebrać w ciągu dwóch dni. W przypadku gdy są zbierane w ciągu dwóch dni, wszystkie zarodki poddane działaniu substancji, które zebrano pierwszego dnia, są łączone z zarodkami zebranymi drugiego dnia. Następnie wszystkie połączone zarodki z każdego zabiegu losowo rozdziela się do każdego inkubatora kontrpróby po 20 zarodków na inkubator. Uwaga: Jeżeli pojedynczy zabieg wymaga drugiego dnia zbiorów, wszystkie zabiegi (w tym próby kontrolne) należy poddać tej procedurze. W przypadku gdy po drugim dniu zbierania zarodków liczba zarodków przypadających na

▼M8

zabieg nie jest odpowiednia, aby rozmieścić je po 20 na inkubator, należy zmniejszyć liczbę zarodków rozmieszczonych w ramach tego konkretnego zabiegu do 15 zarodków na inkubator. W przypadku gdy nie ma wystarczającej liczby zarodków, aby rozmieścić je po 15 na inkubator, należy zmniejszyć liczbę inkubatorów z kontrpróbą do takiej, przy której liczba zarodków wystarczy do rozmieszczenia po 15 na inkubator.

121. dnia badania (lub 122. dnia badania, aby zapewnić prawidłowe rozpoczęcie F2), pary hodowlane F1 humanitarnie się uśmierca i bada pod kątem punktów końcowych osobników dorosłych. W razie potrzeby pary hodowlane F1 można utrzymać przez dodatkowe 1–2 dni, aby wznowić F2.

Tygodnie badania 19–20 (F2)

Dzień do dwóch dni przed przewidywanym rozpoczęciem wylęgu należy zaprzestać poruszania inkubowanymi jajami lub ograniczyć je, aby usprawnić wylęg. W przypadku gdy badanie kończy się wylęgiem F2, każdego dnia młody narybek liczy się i usuwa. (Zarodki, z których nie wylęgł się narybek po przedłużonym czasie inkubacji, definiowanym jako dwukrotność mediany dnia wylęgu w próbie kontrolnej, uznaje się za niezdolne do życia).

▼M8

Dodatek 10

ANALIZA STATYSTYCZNA

Rodzaje danych biologicznych uzyskanych przy pomocy MEOGRT nie są dla niego niepowtarzalne i, z wyjątkiem danych dotyczących patologii, opracowano wiele odpowiednich metod statystycznych w celu właściwej analizy podobnych danych w zależności od ich charakterystyki, w tym normalności, jednorodności wariancji, tego, czy projekt badania nadaje się do testowania hipotez lub analizy regresji, testów parametrycznych i nieparametrycznych itp. Zasadniczo sugerowane analizy statystyczne są zgodne z zaleceniami OECD dotyczącymi danych na temat ekotoksyczności (OECD 2006), a schemat decyzyjny dotyczący analizy danych MEOGRT przedstawiono na rys. 2.

Zakłada się, że najczęściej zbiory danych będą wykazywały reakcje monotoniczne. Ponadto należy rozważyć kwestię użycia jednostronnego testu statystycznego w porównaniu z dwustronnym testem statystycznym. Zaleca się użycie testu jednostronnego, o ile nie istnieje uzasadnienie biologiczne, które sprawia, że test jednostronny jest nieodpowiedni. Chociaż w niniejszej sekcji zaleca się pewne testy statystyczne, jeżeli opracowane zostaną bardziej odpowiednie lub silniejsze metody statystyczne do stosowania w odniesieniu do konkretnych danych uzyskanych przy użyciu MEOGRT, należy używać tych testów statystycznych w celu wykorzystania tych przewag.

Dane MEOGRT należy analizować oddzielnie dla każdej płci genetycznej. Istnieją dwie strategie analizy danych dotyczących ryb o odwróconej płci (albo samców XX, albo samic XY). 1) Można usunąć dane dotyczące ryb o odwróconej płci z całego testu oprócz częstości występowania odwróconej płci w każdej kontrpróbie. 2) Można zostawić dane dotyczące wszystkich ryb o odwróconej płci w zbiorze danych i przeprowadzić analizę na podstawie genotypu.

Dane histopatologiczne

Dane histopatologiczne zgłasza się w postaci stopni nasilenia zmian, ocenianych przy pomocy nowo opracowanej procedury statystycznej, testu Rao-Scotta Cochrane'a-Armitage'a by Slices (RSCABS) (Green *et al.*, 2014). Poprawka *Rao-Scotta* zachowuje informacje dotyczące powtórzeń testu; procedura *by Slices* uwzględnia przewidywanie biologiczne, że stopień nasilenia zmian zazwyczaj rośnie wraz z rosnącym badanym stężeniem. Dla każdej diagnozy wynik RSCABS określa, które zabiegi mają wyższą częstość występowania patologii niż próby kontrolne i związany z nimi poziom nasilenia.

Dane dotyczące potencjału reprodukcyjnego

Analizy danych dotyczących potencjału reprodukcyjnego obejmują test regresyjny Jonckheere'a-Terpstra lub Williamsa, aby określić efekty poddania działaniu substancji, pod warunkiem że dane są zgodne z monotoniczną zależnością stężenie-odpowiedź. Przy pomocy testu regresyjnego dokonuje się wszystkich porównań na poziomie istotności 0,05, nie biorąc poprawki na liczbę porównań. Zakłada się spójność danych z monotoniczną zależnością stężenie-odpowiedź, ale można to zweryfikować albo przy pomocy kontroli wzrokowej danych, albo przy pomocy konstrukcji liniowych i kwadratowych kontrastów średnich zabiegu po uszeregowaniu danych według kategorii. Test trendu uznaje się za wykonany, chyba że kontrast kwadratowy jest istotny, a kontrast liniowy nie. W pozostałych przypadkach do określenia efektów zabiegu używa się testu Dunnetta, jeżeli dane mają rozkład normalny o jednorodnej wariancji. Jeżeli te wymogi nie są spełnione, używa się testu Dunna z poprawką Bonferonniego-Holma. Wszystkie wskazane testy przeprowadza się niezależnie od dowolnego ogólnego testu F lub testu Kruskala-Wallisa. Szczegółowe informacje można znaleźć w OECD 2006.

▼M8

Można wykorzystywać metody alternatywne, takie jak uogólniony model liniowy z błędami Poissona dla liczby jaj (bez transformacji), jeżeli jest to uzasadnione statystycznie (Cameron i Trividi, 2013). W przypadku użycia metody alternatywnej, zaleca się skorzystanie z doradztwa statystycznego.

Codzienne zliczanie jaj przy jednym pokoleniu

Model ANOVA wyznacza się następująco: Y=Czas*Czas + Zabieg + *Zabieg + Czas*Zabieg + *Czas*Zabieg, przy efektach losowych: Kontrpróba (Pokolenie*Zabieg) i Czas*Kontrpróba (Zabieg), dopuszczając nierówne komponenty wariancyjne obu rodzajów u wszystkich pokoleń. Czas oznacza tutaj częstotliwość zliczania jaj (np. dzień lub tydzień). Jest to analiza polegająca na powtarzaniu pomiarów, w której korelacje między obserwacjami tych samych kontrprób stanowią przyczynę pomiarowo powtarzalnego charakteru danych.

Efekty główne zabiegu sprawdza się przy pomocy testu Dunnetta (lub Dunnetta-Hsu), w którym uwzględnia się liczbę porównań. Należy uwzględnić efekt główny pokolenia lub czasu, ponieważ przy tych dwóch czynnikach nie istnieje poziom kontrolny, a każda para poziomów stanowi potencjalnie poszukiwane porównanie. W odniesieniu do tych dwóch efektów głównych, w przypadku gdy test F dla efektu głównego jest istotny na poziomie 0,05, wtedy porównania tego czynnika w parach na wszystkich poziomach tego czynnika mogą być testowane na poziomie 0,05 bez dodatkowej korekty.

Model obejmuje interakcje dwóch i trzech czynników, aby efekt główny, np. dla czasu, nie był istotny, pomimo istotnego wpływu czasu na wyniki. Dlatego jeżeli interakcja dwóch lub trzech czynników obejmująca czas jest istotna na poziomie 0,05, wtedy porównania ilości czasu na poziomie istotności 0,05 można przyjąć bez dodatkowej korekty.

Następne są testy F istotności zabiegu w czasie, tzw. części w tabeli ANOVA. Jeżeli na przykład część obejmująca pokolenie F1 i czas 12 jest istotna na poziomie 0,05, porównania par dla zabiegu obejmującego pokolenie F1 i czas 12 można przyjąć na poziomie istotności 0,05 bez dodatkowej korekty. Podobne twierdzenia mają zastosowanie względem testów czasu obejmujących F1 i zabieg oraz pokolenia w czasie i poddanego zabiegowi.

Ponadto w przypadku porównań nie należących do żadnej z powyższych kategorii należy uwzględnić korektę Bonferroniego-Holma dotyczącą wartości p. Szczegółowe informacje na temat analizy powyższych modeli znajdują się w Hocking (1985) oraz Hochberg i Tamhane (1987).

Alternatywnie surowe dane są odnotowywane i prezentowane w sprawozdaniu z badań jako potencjał reprodukcyjny (liczba jaj) na kontrpróbę na dzień. Należy obliczyć średnią kontrpróby surowych danych, a następnie zastosować przekształcenie pierwiastka kwadratowego. Jednoczynnikową ANOVA średnich kontrprób po przekształceniu należy obliczać zgodnie z kontrastami Dunnetta. Pomocna może się okazać także kontrola wzrokowa danych dotyczących potencjału reprodukcyjnego przy każdym zabiegu lub kontrpróbie przy pomocy wykresu punktowego, pokazującego dane w czasie. Umożliwi to nieformalną ocenę potencjalnych efektów w czasie.

Wszystkie pozostałe dane biologiczne

Analizy statystyczne oparte są na podstawowym założeniu, że przy odpowiednim doborze dawki dane będą monotoniczne. Dlatego zakłada się, że dane są monotoniczne i są formalnie badane pod kątem monotoniczności przy użyciu kontrastów liniowych i kwadratowych. W przypadku gdy dane są monotoniczne, zalecą się przeprowadzenie testu Jonckheere'a-Terpstra na trendzie median kontrpróby (zgodnie z zaleceniami OECD 2006). Jeżeli kontrast kwadratowy jest istotny, a kontrast liniowy nie, dane uznaje się za niemonotoniczne.

▼**M8**

W przypadku gdy dane nie są monotoniczne, w szczególności z powodu obniżonej reakcji jednego lub dwóch zabiegów o najwyższych wartościach, należy rozważyć zredukowanie zbioru danych tak, aby przeprowadzić analizę bez tych zabiegów. Decyzję należy podjąć, uwzględniając fachową opinię i wszystkie dostępne dane, szczególnie te wskazujące na widoczną toksyczność na tych poziomach zabiegów.

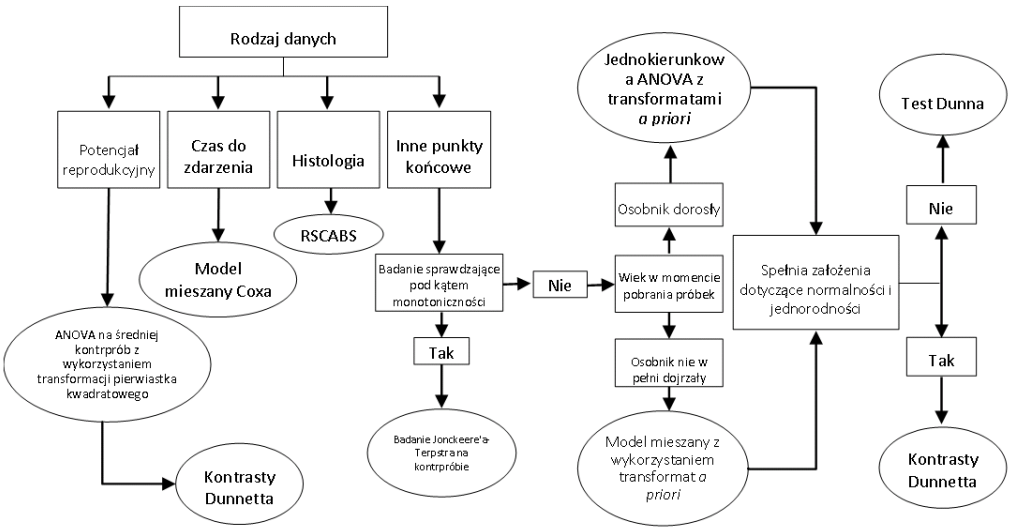
W odniesieniu do masy i długości nie zaleca się transformacji, chociaż sporadycznie mogą być one wskazane. Zaleca się jednak transformację logarytmiczną danych dotyczących witellogeniny; zaleca się transformację pierwiastka kwadratowego danych dotyczących SSC (brodawek płetwy odbytowej); zaleca się przekształcenie pierwiastkowe i arcsin danych dotyczących proporcjonalnego wylęgu, procentowego przeżycia, proporcji płci i procentu płodnych jaj. Czas do wylęgu i czas do pierwszego tarła należy traktować jako dane dotyczące czasu do wystąpienia wydarzenia, przy czym pojedyncze zarodki, które nie wylęgły się w określonym czasie, lub kontrpróby, w których nigdy nie doszło do tarła, traktowane są jako dane ucięte prawostronnie. Czas do wylęgu należy obliczać z mediany dnia wylęgu każdej kontrpróby. Powyższe punkty końcowe należy analizować przy użyciu modelu mieszanego proporcjonalnego hazardu Coxa.

Dane biologiczne z próbek osobników dorosłych obejmują jeden pomiar na kontrpróbę, tj. w akwarium z kontrpróbą utrzymuje się jedną rybę XX i jedną rybę XY. W związku z tym zaleca się przeprowadzenie jednoczynnikowej ANOVA na średnich kontrprób. W przypadku gdy spełnione są założenia ANOVA (normalność i jednorodność wariancji ocenione na podstawie reszt z ANOVA odpowiednio przy użyciu testu Shapiro-Wilksa i testu Levene'a), należy użyć kontrastów Dunnetta do określenia zabiegów, które różniły się od próby kontrolnej. Z drugiej strony, jeżeli założenia ANOVA nie są spełnione, należy przeprowadzić test Dunna, aby określić, które zabiegi różniły się od próby kontrolnej. Podobną procedurę zaleca się względem danych ujętych w formie procentów (płodność, wylęg i przeżywalność).

Dane biologiczne otrzymane z próbek osobników nie w pełni dojrzałych obejmują 1–8 pomiarów na kontrpróbę, tj. liczby osobników, na podstawie których oblicza się średnią kontrpróby dla każdej płci genetycznej, mogą być zmienne. Dlatego zaleca się wykorzystanie kontrastów Dunnetta po użyciu mieszanego modelu ANOVA, jeżeli spełniono założenia normalności i jednorodności wariancji (w odniesieniu do reszt mieszanego modelu ANOVA). Jeżeli nie zostały one spełnione, należy przeprowadzić test Dunna, aby określić, które zabiegi różniły się od próby kontrolnej.

Rys. 2

Schemat działań do analizy danych MEOGRT dla zalecanych procedur statystycznych



▼**M8**

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (załączniki do tej publikacji stanowią osobny dokument). Paryż: OECD Publishing.

(2) Cameron AC i 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 i Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

▼M8

C.53. TEST WZROSTU I ROZWOJU PŁAZÓW W STADIUM LARWALNYM (LAGDA)

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 241 (2015). Konieczność opracowania i walidacji testu umożliwiającego określenie i opisanie niekorzystnych skutków narażenia płazów na działanie toksycznych substancji chemicznych wynika z obawy, że środowiskowe poziomy substancji chemicznych mogą wywoływać działania niepożądane zarówno u ludzi, jak i zwierząt wolno żyjących. W wytycznej OECD dotyczącej testu wzrostu i rozwoju płazów w stadium larwalnym (LAGDA) opisano badanie toksyczności z udziałem gatunku płazów, w ramach którego analizuje się wzrost i rozwój od momentu zapłodnienia do wczesnego etapu młodocianego stadium życia. W teście tym (trwającym zazwyczaj 16 tygodni) ocenia się rozwój na wczesnym etapie, przeobrażenie, przeżywalność, wzrost i częściową dojrzałość płciową. Umożliwia on również pomiar wszystkich pozostałych punktów końcowych, co pozwala na przeprowadzenie oceny diagnostycznej substancji, co do których podejrzewa się, że mogą zaburzać funkcjonowanie układu hormonalnego, lub innych typów substancji toksycznych zaburzających funkcjonowanie układu rozrodczego i rozwój. Sposób opisany w niniejszej metodzie badawczej wywodzi się z prac walidacyjnych dotyczących platany szponiastej (łac. *Xenopus laevis*), przeprowadzonych przez Agencję Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (EPA) przy wsparciu Japonii (1). Mimo że inne gatunki płazów można przystosować do protokołu badania wzrostu i rozwoju, którego ważnym elementem jest możliwość określenia płci genetycznej, konkretne metody i punkty końcowe obserwacji wyszczególnione w niniejszej metodzie badawczej mają zastosowanie wyłącznie do platany szponiastej.

2. Test LAGDA jest dotyczącym płazów badaniem wyższego rzędu, które stosuje się do pozyskania bardziej wyczerpujących informacji na temat szkodliwych skutków w kontekście zależności stężenie-odpowiedź i które jest odpowiednie do określenia i opisania zagrożeń oraz do oceny ryzyka dla środowiska. Test wpasowuje się w poziom 4 ram koncepcyjnych OECD w zakresie badania i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (ang. OECD *Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*), gdzie testy *in vivo* również dostarczają danych na temat działań niepożądanych dotyczących punktów końcowych istotnych pod względem hormonalnym (2). Ogólny schemat doświadczalny obejmuje narażenie zarodków platany szponiastej w 8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (NF) (3) na działanie co najmniej czterech różnych stężeń badanej substancji chemicznej (zazwyczaj w odstępach co najmniej półlogarytmicznych) oraz próbę kontrolną (próby kontrole) do upłynięcia 10 tygodni po medianie czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w próbie kontrolnej, jak również jedną podpróbkę pobieraną w trakcie trwania badania po osiągnięciu 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (≤ 45 dni po zapłodnieniu; zazwyczaj około 45 dnia po zapłodnieniu). W odniesieniu do każdego badanego stężenia przygotowuje się cztery kontrpróby, a próba kontrolna zawiera osiem kontrprób. Punkty końcowe oceniane podczas narażania (podczas pobierania podpróbki w trakcie trwania badania i pobierania próbki końcowej na zakończenie badania) obejmują punkty końcowe wskazujące na toksyczność ogólną: śmiertelność, nietypowe zachowanie i oznaczenia wzrostu (długość i masa), a także punkty końcowe mające charakteryzować określone sposoby działania toksycznego na układ hormonalny ukierunkowane na procesy fizjologiczne pośredniczone przez estrogen, androgen lub tarczycę. W metodzie tej główny nacisk kładzie się na potencjalne skutki istotne dla populacji (takie jak niekorzystny wpływ na przeżywalność, rozwój, wzrost i rozrodczość), aby obliczyć stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub stężenie efektywne powodujące zmianę mierzonego punktu końcowego o × % (EC_x). Należy jednak zaznaczyć, że metody oparte na EC_x rzadko są odpowiednie w przypadku dużych badań tego rodzaju, w których zwiększenie liczby badanych stężeń w celu umożliwienia określenia pożądanego EC_x może być niepraktyczne. Należy również zaznaczyć, że metoda ta nie obejmuje samego etapu rozmnażania. Definicje stosowane w niniejszej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

3. Ze względu na ograniczoną liczbę badanych substancji chemicznych i laboratoriów zaangażowanych w walidację tego dość złożonego testu, szczególnie ze względu na niedokumentowaną dotychczas odtwarzalność międzylaboratoryjną przy użyciu danych doświadczalnych, przewiduje się, że gdy

▼M8

dostępna liczba badań będzie wystarczająca, aby ustalić wpływ tego nowego projektu badania, wówczas dotycząca badań wytyczna OECD nr 241 zostanie poddana przeglądowi i w razie potrzeby zmieniona w świetle zdobytych doświadczeń. Badanie LAGDA jest ważnym testem mającym na celu zwrócenie uwagi na potencjalne przyczyny spadku liczebności populacji płazów poprzez ocenę efektów narażenia na działanie substancji chemicznej w czasie wrażliwego stadium larwalnego, podczas którego wpływ na przeżywalność i rozwój, w tym normalny rozwój narządów płciowych, może mieć negatywne skutki dla populacji.

4. Badanie opracowano w celu wykrycia szczytowego punktu końcowego (punktów końcowych) wynikającego z funkcjonowania zarówno mechanizmu hormonalnego, jak i mechanizmów innych niż hormonalne, i obejmuje diagnostyczne punkty końcowe, które są częściowo charakterystyczne dla kluczowych zmian hormonalnych. Należy zaznaczyć, że przed opracowaniem badania LAGDA nie istniał żaden zweryfikowany test spełniający tę funkcję w odniesieniu do płazów.

5. Ważne jest, aby przed rozpoczęciem testu posiadać informacje o właściwościach fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, w szczególności aby możliwe było tworzenie stabilnych roztworów chemicznych. Należy również posiadać odpowiednio czułą metodę analityczną na potrzeby weryfikacji stężeń badanych substancji chemicznych. Aby zapewnić wystarczającą moc testu na potrzeby oceny punktów końcowych istotnych dla populacji, takich jak wzrost, rozwój i dojrzałość płciowa, do testu (trwającego około 16 tygodni) potrzeba łącznie 480 zwierząt, tj. zarodków platany szponiastej (lub 640 zarodków, jeżeli stosowana jest próba kontrolna z rozpuszczalnikiem).

6. Przed zastosowaniem metody badawczej w badaniu regulacyjnym mieszaniny należy zastanowić się nad tym, czy wyniki uzyskane w wyniku jej stosowania będą możliwe do zaakceptowania w odniesieniu do założonego celu regulacyjnego. Ponadto w niniejszym teście nie ocenia się bezpośrednio potencjału reprodukcyjnego, dlatego jest możliwe, że nie będzie można go zastosować na etapie bardziej zaawansowanym niż poziom 4 ram koncepcyjnych OECD w zakresie badania i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego.

PODSTAWA NAUKOWA METODY BADAWCZEJ

7. Znaczną część naszej obecnej wiedzy dotyczącej biologii płazów uzyskano przy użyciu laboratoryjnego gatunku modelowego, platany szponiastej. Gatunek ten można rutynowo hodować w laboratorium, owulację można wywołać przy pomocy ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG), a stada zwierząt są łatwo dostępne u hodowców komercyjnych.

8. Rozmnażanie płazów, jak wszystkich kręgowców, jest kontrolowane przez oś podwzgórze–przysadka–gonady (HPG) (4). Estrogeny i androgeny są przekaźnikami tego układu hormonalnego – ukierunkowują rozwój i fizjologię tkanek wykazujących dymorfizm płciowy. Można wyróżnić trzy etapy cyklu życia płazów, na których przedmiotowa oś jest wyjątkowo aktywna: 1) różnicowanie gonad podczas rozwoju w stadium larwalnym, 2) rozwój drugorzędowych cech płciowych i dojrzewanie gonad w stadium młodocianym oraz 3) funkcjonalne rozmnażanie osobników dorosłych. Każde z tych trzech okien rozwojowych może być podatne na zaburzenia hormonalne powodowane przez niektóre substancje chemiczne, takie jak estrogeny i androgeny, co ostatecznie prowadzi do utraty zdolności do rozmnażania przez te organizmy.

9. Rozwój gonad rozpoczyna się w 43. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, w którym rozpoczyna się rozwój bipotencjalnych zawiązków gonad. Różnicowanie gonad rozpoczyna się w 52. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, kiedy komórki prapłciowe migrują do tkanki rdzeniowej (samce)

▼M8

albo pozostają w okolicy korowej (samice) rozwijających się gonad (3). Pierwsze zgłoszenie dotyczące podatności procesu różnicowania płciowego gonad na zmiany w wyniku działania substancji chemicznych u rodzaju *Xenopus* miało miejsce w latach 50. XX wieku (5)(6). Narażenie kijanek na działanie estradiolu w okresie różnicowania gonad powoduje odwrócenie płci u samców, które w momencie osiągnięcia dorosłości są w pełni funkcjonalnymi samicami (7)(8). Możliwe jest również funkcjonalne odwrócenie płci u samic (przekształcenie w samce), co zgłoszono po wszczepieniu kijance tkanki jądra (9). Mimo że narażenie na działanie inhibitora aromatazy powoduje funkcjonalne odwracanie płci również u afrykańskiej żaby szponiastej (*X. tropicalis*) (10), nie wykazano, że występuje ono u platany szponiastej. W przeszłości toksyczne oddziaływanie na różnicowanie gonad oceniano poprzez badanie histologiczne gonad na etapie przeobrażenia, a odwrócenie płci stwierdzano jedynie na podstawie analizy proporcji płci. Do niedawna nie było możliwości bezpośredniego określenia płci genetycznej osobników z rodzaju *Xenopus*. Niedawne określenie markerów związanych z płcią u platany szponiastej umożliwia jednak określenie płci genetycznej i bezpośrednią identyfikację zwierząt o odwróconej płci (11).

10. U samców rozwój w stadium młodocianym postępuje wraz ze wzrostem poziomu testosteronu we krwi, który odpowiada za rozwój drugorzędowych cech płciowych oraz rozwój jąder. U samic jajniki produkują estradiol, co powoduje pojawienie się witellogeniny (VTG) w osoczu, witelogennych oocytów w jajniku i rozwój jajowodów (12). Jajowody stanowią żeńskie drugorzędowe cechy płciowe, które odgrywają swoją rolę w procesie dojrzewania oocytów podczas rozmnażania. Osłonka galaretowata otacza zewnętrzną część oocytów, gdy przechodzą one przez jajowód i gromadzą się w pęcherzyku jajnikowym, gotowe do zapłodnienia. Estrogeny zdają się regulować rozwój jajowodów, ponieważ jest on skorelowany z poziomem estradiolu we krwi u platany szponiastej (13) i afrykańskiej żaby szponiastej (12). Odnotowano rozwój jajników u samców po narażeniu na działanie związków polichlorowanego bifenylu (14) i 4-tert-oktylofenolu (15).

ZASADA BADANIA

11. Projekt badania obejmuje narażenie drogą wodną zarodków platany szponiastej w 8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Faberana na działanie czterech różnych stężeń badanej substancji chemicznej oraz próbę kontrolną (próby kontrolne) do upłynięcia 10 tygodni po medianie czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w próbie kontrolnej, jak również jedną podpróbkę pobieraną w trakcie trwania badania po osiągnięciu 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. Chociaż dawkowanie substancji chemicznych o silnych właściwościach hydrofobowych jest również możliwe drogą pokarmową, dotychczasowe doświadczenie w stosowaniu tej drogi narażenia w niniejszym teście jest niewielkie. W odniesieniu do każdego badanego stężenia przygotowuje się cztery kontrpróby, a każda wykorzystana próba kontrolna zawiera osiem kontrprób. Punkty końcowe oceniane w trakcie narażenia obejmują punkty wskazujące na toksyczność ogólną (tj. śmiertelność, nietypowe zachowanie i oznaczenia wzrostu (długość i masa)), jak również punkty końcowe mające charakteryzować określone sposoby działania toksycznego na układ hormonalny ukierunkowane na procesy fizjologiczne pośredniczone przez estrogen, androgen lub tarczycę (tj. histopatologia tarczycy, histopatologia gonad i nasieniowodów, nietypowy rozwój, witellogenina w osoczu (opcjonalnie) oraz genotypowe/fenotypowe proporcje płci).

KRYTERIA WAŻNOŚCI BADANIA

12. Zastosowanie mają następujące kryteria ważności badania:

— stężenie rozpuszczonego tlenu powinno wynosić ≥ 40 % wartości nasycenia powietrzem w trakcie badania;

▼M8

— temperatura wody powinna mieścić się w zakresie 21 ± 1 °C, a różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny przekraczać 1,0 °C;

— pH badanego roztworu należy utrzymać w przedziale 6,5–8,5, a różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny przekraczać 0,5;

— powinny być dostępne dowody pozwalające wykazać, że stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze utrzymano w granicach ± 20 % średnich wartości pomiarowych;

— śmiertelność w okresie narażenia powinna wynosić ≤ 20 % w każdej kontrpróbie w próbach kontrolnych;

— żywotność tarła wybranego do rozpoczęcia badań powinna wynosić ≥ 70 %;

— mediana czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera powinna wynosić ≤ 45 dni;

— średnia masa organizmów użytych do badań w 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera i na zakończenie testu w próbach kontrolnych i próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem (jeżeli są stosowane) powinna wynosić odpowiednio 1,0 ± 0,2 i 11,5 ± 3 g.

13. Chociaż kryterium to nie stanowi kryterium ważności, zaleca się, aby do analizy dostępne były co najmniej trzy poziomy zabiegu z trzema niezakłóconymi kontrpróbami. Nadmierną śmiertelność, która zakłóca zabieg, definiuje się jako > 4 przypadki śmiertelne (> 20 %) w dwóch kontrpróbach lub większej ich liczbie, których nie można wytłumaczyć błędem technicznym. Do celów analizy powinny być dostępne co najmniej trzy poziomy zabiegu bez wyraźnie widocznej toksyczności. Oznaki widocznej toksyczności mogą obejmować między innymi unoszenie się na powierzchni, leżenie na dnie zbiornika, pływanie brzuchem do góry lub w nieregularny sposób, brak wynurzania się na powierzchnię oraz brak reakcji na bodźce, nieprawidłowości morfologiczne (np. zdeformowane kończyny), krwawiące uszkodzenia i obrzęk brzucha.

14. W przypadku zaobserwowania odchylenia od kryteriów ważności badania skutki tych odchyleń należy przeanalizować w odniesieniu do wiarygodności wyników badania, a w sprawozdaniu z badania należy uwzględnić zarówno takie odchylenia, jak i dotyczące ich uwagi.

OPIS METOD

Aparatura

15. Zwykły sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

a) aparatura do regulacji temperatury (np. urządzenia do ogrzewania lub chłodzenia (ustawione na temperaturę 21 ± 1 °C));

▼M8

b) termometr;

c) dwuokularowy mikroskop preparacyjny i narzędzia preparacyjne;

d) aparat cyfrowy o rozdzielczości co najmniej 4 megapikseli i z funkcją mikro (w razie potrzeby);

e) waga analityczna umożliwiająca pomiar z dokładnością do 0,001 mg lub 1 μg;

f) miernik rozpuszczonego tlenu i miernik pH;

g) miernik natężenia światła umożliwiający pomiar w luksach.

Woda

Źródło i jakość

16. Można użyć każdej wody rozcieńczającej, która jest dostępna w danym miejscu (np. woda źródlana lub woda wodociągowa przefiltrowana przez filtr węglowy) i która umożliwia normalny wzrost i rozwój platany szponiastej; dostępne powinny być dowody potwierdzające normalny wzrost w tej wodzie. Ponieważ jakość lokalnie dostępnej wody może znacząco różnić się w zależności od obszaru, należy wykonać analizy jakości wody, w szczególności jeżeli nie są dostępne dane historyczne dotyczące przydatności wody do hodowli larw płazów. Jeżeli wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, przed testem lub np. co sześć miesięcy należy oznaczać zawartość metali ciężkich (np. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pestycydów, zawartość całkowitego węgla organicznego i zawiesinę ogólną. Niektóre właściwości chemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej wymieniono w dodatku 2.

Stężenie jodku w badanej wodzie

17. Aby tarczyca mogła syntezować hormony tarczycy warunkujące prawidłowy przebieg przeobrażenia, larwy powinny mieć dostęp do wystarczającej ilości związków jodu dostarczonych za pośrednictwem wody lub pożywienia. Obecnie nie istnieją żadne określone empirycznie wytyczne dotyczące minimalnego stężenia jodu w pożywieniu albo wodzie, które zapewniłyby właściwy rozwój. Obecność jodu może jednak wpływać na zdolność reagowania tarczycy na substancje aktywne oddziałujące na gruczoł tarczowy i wiadomo, że jod moduluje podstawową aktywność tarczycy, którą należy uwzględnić, interpretując wyniki badania histopatologicznego tarczycy. W oparciu o wcześniejsze prace wykazano, że test wykonano z powodzeniem, gdy stężenia jodku (Γ) w wodzie rozcieńczającej wynosiły od 0,5 do 10 μg/l. Najlepiej byłoby, gdyby minimalne stężenie jodku w wodzie rozcieńczającej wynosiło 0,5 μg/l przez całe badanie (dodanego jako sól sodowa lub potasowa). Jeżeli do badania stosowana jest woda regenerowana odtworzona z wody dejonizowanej, należy dodać jod w minimalnym stężeniu wynoszącym 0,5 μg/l. Należy odnotować zmierzone stężenia jodku w badanej wodzie (tj. wodzie rozcieńczającej) oraz uzupełnienie badanej wody jodem lub innymi solami (jeżeli są stosowane). Zawartość jodu można również zmierzyć w pożywieniu, nie tylko w wodzie badanej.

Układ narażenia

18. Badanie opracowano przy użyciu układu przepływowego z wykorzystaniem rozcieńczalnika. Części składowe układu, które mają kontakt z wodą, powinny być wykonane ze szkła, stali nierdzewnej lub innych chemicznie obojętnych materiałów. Jako zbiorniki do badań narażenia należy stosować akwaria wykonane ze szkła lub stali nierdzewnej, o objętości od około 4,0 do 10,0 l i minimalnej głębokości wody 10–15 cm. Układ powinien umożliwiać utrzymanie wszystkich stężeń ekspozycyjnych, próby kontrolnej,

▼M8

próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem, w razie potrzeby, z czterema kontrpróbami na każdy zabieg i ośmioma w próbach kontrolnych. Natężenie przepływu do każdego zbiornika powinno być stałe ze względu na utrzymanie zarówno warunków biologicznych, jak i narażenia chemicznego. Zaleca się, aby natężenia przepływu były odpowiednie (np. co najmniej 5 obrotów zbiornika dziennie), aby uniknąć spadku stężenia substancji chemicznej w wyniku metabolizmu zarówno organizmów użytych do badań, jak i mikroorganizmów wodnych obecnych w akwariach, albo abiotycznych dróg rozpadu (hydroliza, fotoliza) lub rozpraszania (parowanie, sorpcja). Zbiorniki zabiegowe należy losowo umieścić w układzie narażenia w celu ograniczenia ewentualnych skutków wynikających z ich umiejscowienia, między innymi niewielkich różnic temperatury, natężenia światła itd. W celu uzyskania dalszych informacji dotyczących skompilowania przepływowych układów ekspozycji należy zapoznać się z opracowanymi przez ASTM wytycznymi dotyczącymi przeprowadzania badań toksyczności ostrej na materiale badawczym przy użyciu ryb, dużych bezkręgowców i płazów (S*tandard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians*) (16).

Dostarczanie substancji chemicznej: przygotowanie roztworów do badań

19. Aby przygotować roztwory do badań w układzie narażenia, roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej należy dozować do układu narażenia za pomocą odpowiedniej pompy lub innego urządzenia. Przed rozpoczęciem narażenia należy przeprowadzić kalibrację natężenia przepływu roztworu podstawowego zgodnie z analitycznym potwierdzeniem roztworów do badań, a podczas badania należy je okresowo sprawdzać objętościowo. Roztwór do badań w każdej komorze należy odnawiać co najmniej 5 razy dziennie.

20. Metoda wprowadzania badanej substancji chemicznej do układu może różnić się w zależności od właściwości fizykochemicznych substancji. Dlatego też przed badaniem należy uzyskać podstawowe informacje na temat substancji chemicznej, które są istotne z punktu widzenia określenia jej testowalności. Użyteczne informacje na temat właściwości konkretnych badanych substancji chemicznych obejmują: wzór strukturalny, masę cząsteczkową, czystość, stabilność w wodzie i świetle, pK_a i K_{ow}, rozpuszczalność w wodzie (najlepiej w środowisku badania) i prężność par, jak również wyniki badania szybkiej biodegradowalności (metoda badania C.4 (17) lub C.29 (18)). Rozpuszczalność w wodzie i prężność par mogą posłużyć do obliczenia stałej Henry'ego, która wskaże, czy istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia strat wskutek parowania badanej substancji chemicznej. W przypadku braku informacji wymienionych powyżej należy dokładnie rozważyć zasadność przeprowadzenia tego badania, ponieważ plan badania będzie zależał od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, a brak tych danych może utrudnić interpretację wyników badania lub sprawić, że będą one niezrozumiałe. Dostępna powinna być wiarygodna metoda analityczna do oznaczania ilościowego badanej substancji chemicznej w roztworach ze znaną i udokumentowaną dokładnością oraz granicą wykrywalności. Rozpuszczalne w wodzie badane substancje chemiczne mogą być rozpuszczone w podwielokrotnościach wody rozcieńczającej w stężeniu umożliwiającym osiągnięcie docelowego badanego stężenia w układzie przepływowym. Substancje chemiczne, które mają ciekły lub stały stan skupienia w temperaturze pokojowej i są średnio rozpuszczalne w wodzie, mogą wymagać wprowadzenia przy użyciu saturatora ciecz-ciecz lub ciecz-ciało stałe (np. z kolumną wypełnioną watą szklaną) (19). Chociaż dawkowanie badanych substancji chemicznych o silnych właściwościach hydrofobowych jest również możliwe drogą pokarmową, doświadczenie w stosowaniu tej drogi narażenia w niniejszym teście jest niewielkie.

21. Roztwory do badań o wybranych stężeniach przygotowuje się przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Zaleca się przygotowanie roztworu podstawowego przez zwykłe wymieszanie lub zbełtanie badanej substancji chemicznej w wodzie rozcieńczającej w sposób mechaniczny (np. za pomocą mieszadła lub ultradźwięków). Do uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego można wykorzystać kolumny/układy nasyceniowe lub metody pasywnego dawkowania (20). Preferowany jest układ badawczy

▼M8

niezawierający rozpuszczalnika obojętnego; różne badane substancje chemiczne będą jednak wykazywały różne właściwości fizykochemiczne, które prawdopodobnie będą wymagały różnych metod przygotowania wody służącej do narażenia na działanie substancji chemicznej. Należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć wykorzystania rozpuszczalników lub nośników, ponieważ: 1) niektóre rozpuszczalniki same mogą powodować toksyczność lub niepożądane albo nieoczekiwane reakcje, 2) badanie substancji chemicznych, których rozpuszczalność w wodzie zostaje przekroczona (co często ma miejsce w wyniku stosowania rozpuszczalników), może skutkować niedokładnym określeniem stężeń efektywnych, 3) stosowanie rozpuszczalników w przypadku badań długoterminowych może skutkować znacznym rozrostem biofilmu związanym z aktywnością mikroorganizmów, co może wpłynąć na warunki środowiskowe, a także na zdolność do utrzymania stężenia podczas narażenia oraz 4) w przypadku braku danych historycznych, które potwierdziłyby brak wpływu rozpuszczalnika na wynik badania, użycie rozpuszczalników wymaga przeprowadzenia zabiegu z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem, co ma znaczne konsekwencje dla dobrostanu zwierząt, ponieważ przeprowadzenie badania wymaga użycia dodatkowych zwierząt. W przypadku substancji chemicznych, których badanie nastręcza trudności, rozpuszczalnik można zastosować tylko w ostateczności, a w celu wyboru najlepszej metody należy zapoznać się z wytyczną OECD dotyczącą badania toksyczności wodnej trudnych substancji i mieszanin (*Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*) (21). Wybór rozpuszczalnika będzie uwarunkowany właściwościami chemicznymi badanej substancji chemicznej i dostępnością historycznych danych kontrolnych dotyczących tego rozpuszczalnika. W przypadku braku danych historycznych przed przeprowadzeniem ostatecznych badań należy określić przydatność rozpuszczalnika. W przypadku gdy nie można uniknąć użycia rozpuszczalnika, a występuje aktywność mikroorganizmów (biofilm), zaleca się rejestrowanie biofilmu na zbiornik (co najmniej raz w tygodniu) podczas całego badania. Najlepiej byłoby, gdyby stężenie rozpuszczalnika było utrzymywane na stałym poziomie w próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem i we wszystkich zabiegach. Jeżeli stężenie rozpuszczalnika nie jest utrzymywane na stałym poziomie, do próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem należy użyć jego najwyższego stężenia w próbie badanej poddanej działaniu substancji. W przypadkach gdy używane są nośniki rozpuszczalnikowe, maksymalne stężenia rozpuszczalnika nie powinny przekraczać 100 µl/l lub 100 mg/l (21), przy czym zaleca się, aby stężenie rozpuszczalnika pozostawało jak najniższe (np. $\leq$20 µl/l), aby uniknąć potencjalnego wpływu rozpuszczalnika na mierzone punkty końcowe (22).

Zwierzęta użyte do badania

Badany gatunek

22. Badanym gatunkiem jest platana szponiasta, ponieważ: 1) gatunek ten hoduje się rutynowo w laboratoriach na całym świecie; 2) jest on łatwo dostępny za pośrednictwem dostawców komercyjnych oraz 3) możliwe jest określenie jego płci genetycznej.

Opieka nad osobnikami dorosłymi i hodowla

23. Odpowiednie metody opieki nad platanąszponiastą oraz jej hodowli opisano w znormalizowanych wytycznych (23). Kwestie trzymania platany szponiastej i opieki nad nią również opisał Read (24). W celu nakłonienia zwierząt do rozmnażania się trzem do pięciu parom dorosłych samic i samców wstrzykuje się dootrzewnowo ludzką gonadotropinę kosmówkową (hCG). Żeńskim i męskim osobnikom wstrzykuje się odpowiednio 800–1 000 IU i 500–800 IU hCG rozpuszczonego w 0,6–0,9 % roztworze soli fizjologicznej (lub żabim roztworze Ringera, izotonicznym roztworze soli fizjologicznej do stosowania u płazów. Objętość iniekcji powinna wynosić około 10 µl/g masy ciała (~1 000 µl). Następnie indukowane pary hodowlane trzymane są w dużych zbiornikach zapewniających spokój i niezmienne warunki dla przyjęcia pozycji ampleksusu. Dno każdego akwarium reprodukcyjnego powinno posiadać fałszywe dno wykonane z siatki ze stali nierdzewnej (np. otwory o średnicy 1,25 cm), które umożliwia opadanie jaj na dno zbiornika. Żaby, które otrzymały zastrzyk hCG późnym popołudniem, zazwyczaj złożą większość skrzeku późnym rankiem następnego dnia. Po złożeniu i zapłodnieniu wystarczającej liczby komórek jajowych osobniki dorosłe należy usunąć z akwariów reprodukcyjnych. Następnie jaja zbiera się, a osłonki galaretowate usuwa się, poddając je działaniu L-cysteiny (23). Należy przygotować 2 % roztwór L-cysteiny i wyregulować pH do 8,1 przy użyciu 1 M NaOH. Ten roztwór o temperaturze 21 °C dodaje się do kolby

▼M8

Erlenmeyera o pojemności 500 ml zawierającej jaja z jednego tarła, którą delikatnie się potrząsa przez jedną do dwóch minut, a następnie jaja 6–8 razy dokładnie przepłukuje się wodą do hodowli o temperaturze 21 °C. Następnie jaja przenosi się do krystalizatora i oznacza jako > 70 % żywotne przy minimalnych nieprawidłowościach w zarodkach wykazujących podział komórek.

PROJEKT BADANIA

Badane stężenia

24. Zaleca się stosowanie co najmniej czterech stężeń substancji chemicznej i odpowiednich prób kontrolnych (w tym, w razie potrzeby, prób kontrolnych z rozpuszczalnikiem). Przeważnie zaleca się, aby odstępy między stężeniami (współczynnik rozstawienia stężeń) nie przekraczały 3,2.

25. Do celów niniejszego badania przy określaniu najwyższego badanego stężenia należy możliwie w jak największym stopniu korzystać z dotychczasowych badań na płazach, aby uniknąć stężeń, które są nadmiernie toksyczne. W ustaleniu tego stężenia pomocne mogą być informacje pochodzące na przykład z ilościowych zależności struktura-aktywność i badań przekrojowych oraz dane z dotychczasowych badań na płazach, takich jak badanie przeobrażenia płazów, metoda badawcza C.38 (25), oraz badanie teratogenezy w zarodkach żab – *Xenopus* (23) lub badania na rybach, takie jak metody badawcze C.48, C.41 i C.49 (26)(27)(28). Przed rozpoczęciem badania LAGDA można przeprowadzić doświadczenie ustalające zakres stężeń. Zaleca się rozpoczęcie badania zakresu narażenia w ciągu 24 godzin od zapłodnienia i kontynuowanie go przez 7–14 dni (lub więcej, jeżeli to konieczne) oraz ustalenie badanych stężeń w taki sposób, aby kolejne stężenie nie było większe niż 10-krotność poprzedniego. Wyniki eksperymentu ustalającego zakres powinny posłużyć do ustalenia najwyższego badanego stężenia w LAGDA. Należy zauważyć, że jeżeli istnieje potrzeba zastosowania rozpuszczalnika, wówczas w ramach badania ustalającego zakres można stwierdzić stosowność rozpuszczalnika (tj. czy może mieć on wpływ na wynik badania).

Kontrpróby grup poddanych zabiegowi i prób kontrolnych

26. Należy zastosować co najmniej cztery zbiorniki z kontrpróbą na każde badane stężenie oraz co najmniej osiem kontrprób na potrzeby prób kontrolnych (oraz próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem, w razie potrzeby) (tj. w celu zapewnienia odpowiedniej mocy statystycznej konieczne jest, aby liczba kontrprób w próbie kontrolnej oraz dowolnej próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem była dwa razy większa niż liczba kontrprób w każdej grupie poddanej zabiegowi). W każdej kontrpróbie powinno znajdować się nie więcej niż 20 zwierząt. Minimalna liczba zwierząt poddanych zabiegowi powinna wynosić 15 (5 osobników w 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w podpróbce oraz 10 osobników w stadium młodocianym). Do każdej kontrpróby dodaje się jednak dodatkowe zwierzęta, aby uwzględnić ewentualną śmiertelność, zachowując nieprzekraczalną liczbę 15 zwierząt.

PROCEDURA

Przegląd testu

27. Test rozpoczyna się z wykorzystaniem nowo złożonych jaj zawierających zarodki (8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Fabera) i trwa do czasu rozwoju osobników młodych. Zwierzęta bada się codziennie pod kątem śmiertelności oraz wszelkich oznak nietypowego zachowania. W 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera pobiera się podpróbkę osobników w stadium larwalnym (do 5 zwierząt na kontrpróbę) i bada różne punkty końcowe (tabela 1). Gdy wszystkie zwierzęta osiągną 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, tj. proces ich przeobrażania dobiegnie końca (lub gdy minie 70 dni od

▼M8

rozpoczęcia testu, w zależności od tego, co nastąpi wcześniej), przeprowadza się losową eliminację (jednak bez pobierania podpróbek), aby zmniejszyć liczbę zwierząt (do 10 na zbiornik) (zob. pkt 43), a pozostałe zwierzęta pozostają pod wpływem substancji chemicznej w próbie kontrolnej do upłynięcia 10 tygodni po medianie czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w próbie kontrolnej. Po zakończeniu testu (pobieranie próbek osobników w stadium młodocianym) przeprowadza się dodatkowe pomiary (tabela 1).

Warunki narażenia

28. Pełne streszczenie parametrów badania można znaleźć w dodatku 3. W okresie narażenia należy codziennie mierzyć stężenie rozpuszczonego tlenu, temperaturę i pH roztworów do badań. Raz na miesiąc mierzy się przewodność właściwą, zasadowość i twardość. Jeżeli chodzi o temperaturę wody roztworów do badań, różnice między kontrpróbami i między zabiegami (w ciągu jednego dnia) nie powinny przekraczać 1,0 °C. Ponadto, jeżeli chodzi o pH roztworów do badań, różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny również przekraczać 0,5.

29. Zbiorniki do badań narażenia można codziennie czyścić przy użyciu syfonu, aby usunąć niezjedzony pokarm i odchody – należy przy tym zachować ostrożność, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego zbiorników. Należy dbać, aby ograniczyć do minimum stres i traumę, na jakie narażone są zwierzęta, w szczególności podczas poruszania, czyszczenia akwariów i przenoszenia. Należy unikać stresujących warunków/działań, takich jak głośny lub nieustanny hałas, stukanie palcem w akwarium, drgania w zbiorniku.

Czas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej

30. Narażenie rozpoczyna się z wykorzystaniem nowo złożonych jaj zawierających zarodki (8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Fabera) i trwa do czasu upłynięcia dziesięciu tygodni po medianie czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (≤ 45 dni od rozpoczęcia testu) w grupie kontrolnej. Zazwyczaj czas trwania badania LAGDA wynosi 16 tygodni (maksymalnie 17 tygodni).

Rozpoczęcie testu

31. Zwierzęta rodzicielskie wykorzystywane do rozpoczęcia testu powinny uprzednio wydać potomstwo, u którego można określić płeć genetyczną (dodatek 5). Po odbyciu tarła przez osobniki dorosłe zarodki zbiera się, poddaje działaniu cysteiny, aby usunąć osłonkę galaretowaną, i poddaje się je badaniu przesiewowemu pod kątem żywotności (23). Poddanie działaniu cysteiny umożliwia przenoszenie zarodków podczas badania przesiewowego bez przywierania do powierzchni. Badanie przesiewowe przeprowadza się pod mikroskopem stereoskopowym, używając odpowiedniej wielkości kroplomierza do usunięcia zarodków niezdolnych do życia. Zaleca się, aby do badania wykorzystywać jedno tarło, którego żywotność przekracza 70 %. Zarodki w 8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Fabera umieszcza się losowo w zbiornikach do zabiegów narażenia zawierających odpowiednią objętość wody rozcieńczającej do momentu umieszczenia 20 zarodków w każdym zbiorniku. Podczas przenoszenia należy bardzo ostrożnie obchodzić się z zarodkami, aby zminimalizować wynikający z tego stres i nie dopuścić do zranienia. W ciągu 96 godzin od zapłodnienia kijanki powinny przesunąć się w górę słupa wody i zacząć przylegać do boków zbiornika.

Schemat żywienia

32. Częstotliwość karmienia i objętość pokarmu w różnych stadiach rozwoju platany szponiastej są bardzo ważnym aspektem protokołu LAGDA. Należy unikać nadmiernego karmienia w stadium larwalnym, ponieważ zazwyczaj skutkuje ono zwiększoną częstością występowania i dotkliwością skoliozy (dodatek 8). Z kolei nieodpowiednie karmienie w stadium larwalnym skutkuje bardzo zmiennym tempem rozwoju wśród prób kontrolnych, co może mieć negatywny wpływ na moc statystyczną lub zakłócać

▼M8

wyniki badań. W dodatku 4 przedstawiono zalecaną dietę i schematy żywienia platany szponiastej w stadium larwalnym i młodocianym w warunkach przepływu, choć dopuszczalne jest stosowanie metod alternatywnych, o ile organizmy użyte do badań rosną i rozwijają się w sposób zadowalający. Należy zauważyć, że w przypadku pomiaru punktów końcowych właściwych dla układu hormonalnego pokarm nie powinien zawierać substancji endokrynnie czynnych, takich jak mączka sojowa.

Karmienie osobników w stadium larwalnym

33. Zalecana dieta dla larw składa się z pokarmu dla młodych pstrągów, spiruliny w tabletkach oraz pokarmu dla złotych rybek (np. płatki TetraFin®, Tetra, Niemcy) zmieszanych ze sobą w wodzie do hodowli (lub wodzie rozcieńczającej). Mieszaninę tę podaje się trzy razy dziennie w dni powszednie i raz dziennie w weekendy. Począwszy od 8 dnia po zapłodnieniu kijanki można również karmić żywymi solowcami z gatunku *Artemia* spp., 24-godzinnymi larwami, dwa razy dziennie w dni powszednie i raz dziennie w weekendy. Karmienie osobników w stadium larwalnym, które powinno przebiegać tak samo w każdym naczyniu badawczym, powinno także umożliwić właściwy wzrost i rozwój zwierząt użytych do badania, aby zapewnić odtwarzalność i możliwość przenoszenia wyników testu: 1) mediana czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w próbach kontrolnych powinna wynosić ≤ 45 dni oraz 2) zaleca się, aby średnia masa osobników w 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w próbach kontrolnych wynosiła 1,0 ± 0,2g.

Karmienie osobników młodych

34. Po zakończeniu procesu przeobrażania schemat żywienia składa się z wysokiej jakości opadającego na dno pokarmu dla żab np. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, Floryda, Stany Zjednoczone) (dodatek 4). Aby zmniejszyć wielkość granulatu podawanego młodym żabom (osobnikom we wczesnym stadium młodocianym), należy go rozdrabniać przez krótki czas przy użyciu młynka do kawy lub blendera albo pokruszyć za pomocą moździerza i tłuczka. Rozdrabnianie lub kruszenie nie jest już niezbędne w momencie, gdy osobniki młodociane są wystarczająco duże, aby jest granulat w całości. Zwierzęta należy karmić raz dziennie. Karmienie osobników młodocianych powinno umożliwić właściwy wzrost i rozwój organizmów: zaleca się, aby na zakończenie testu średnia masa osobników młodocianych w próbach kontrolnych wynosiła 11,5 ± 3 g.

Chemia analityczna

35. Przed przystąpieniem do testu należy określić stabilność badanej substancji chemicznej (np. rozpuszczalność, degradowalność i lotność) oraz wszystkie potrzebne metody analityczne, np. wykorzystując do tego celu istniejące informacje lub wiedzę. Jeżeli dawkowanie odbywa się za pomocą wody rozcieńczającej, przed rozpoczęciem badania zaleca się zbadanie roztworów z każdego zbiornika z kontrpróbą w celu zweryfikowania efektywności układu. W okresie narażenia stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w odpowiednich odstępach czasu, najlepiej raz na tydzień w co najmniej jednej kontrpróbie z każdej grupy poddanej zabiegowi, co tydzień zmieniając kontrpróby w ramach tej samej grupy poddanej zabiegowi. Zaleca się, aby wyniki były oparte na mierzonych stężeniach. Jeżeli jednak stężenie badanej substancji chemicznej w roztworze można z powodzeniem utrzymywać w zakresie ±20 % stężenia nominalnego przez cały czas trwania badania, wówczas wyniki mogą opierać się albo na wartościach nominalnych, albo na wartościach pomiarowych. Ponadto współczynnik zmienności (CV) zmierzonych badanych stężeń w całym okresie trwania badania w ramach zabiegu w każdym stężeniu należy utrzymywać na poziomie 20 % lub niższym. Jeżeli zmierzone stężenia nie utrzymują się w granicach 80–120 % stężenia nominalnego (np. podczas badania substancji chemicznych charakteryzujących się wysokim stopniem biodegradowalności lub wykazujących silne właściwości adsorpcyjne), należy określić stężenia efektywne i wyrazić je względem średniej arytmetycznej stężenia w badaniach przepływowych.

▼M8

36. Natężenia przepływu wody rozcieńczającej i roztworu podstawowego należy sprawdzać w odpowiednich odstępach czasu (np. trzy razy w tygodniu) przez cały czas trwania narażenia. W przypadku substancji chemicznych, których nie można wykryć w niektórych lub wszystkich stężeniach nominalnych (np. z powodu szybkiej degradacji lub adsorpcji w naczyniach badawczych lub w wyniku znaczącej akumulacji substancji chemicznej w ciałach narażonych zwierząt), zaleca się dostosowanie tempa wymiany roztworu do badań w każdej komorze w taki sposób, aby badane stężenia pozostały możliwie jak najbardziej stałe.

Obserwacje i pomiary punktów końcowych

37. Punkty końcowe oceniane podczas narażenia obejmują punkty wskazujące na toksyczność, w tym śmiertelność, nietypowe zachowanie, takie jak objawy kliniczne choroby lub toksyczności ogólnych, i oznaczenia wzrostu (długość i masa), jak również punkty końcowe z zakresu patologii, które mogą odpowiadać zarówno ogólnej toksyczności, jak sposobom działania toksycznego na układ hormonalny ukierunkowanym na ścieżki pośredniczone przez estrogen, androgen lub tarczycę. Ponadto na końcu testu można opcjonalnie zmierzyć stężenie VTG w osoczu. Pomiar VTG może być przydatny do zrozumienia wyników badania w kontekście mechanizmów hormonalnych, które podejrzewa się, że mogą zaburzać funkcjonowanie układu hormonalnego Punkty końcowe oraz czas pomiarów podsumowano w tabeli 1.

Tabela 1

Przegląd punktów końcowych badania LAGDA

Punkty końcowe (*)	Codziennie	Pobieranie próbek w trakcie badania (pobieranie próbek osobników w stadium larwalnym)	Zakończenie badania (pobieranie próbek osobników młodocianych)
Śmiertelność oraz nieprawidłowości	X		
Czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera		X	
Histo(pato)logia (tarczyca)		X	
Morfometria (wzrost masy i długości)		X	X
Wskaźnik hepatosomatyczny (LSI)			X
Genetyczne/fenotypowe proporcje płci			X
Histopatologia (gonady, drogi rodne, nerki i wątroba)			X
Witellogenina (VTG) (opcjonalnie)			X

(*) Wszystkie punkty końcowe są analizowane statystycznie.

Śmiertelność i codzienne obserwacje

38. Należy codziennie sprawdzać wszystkie zbiorniki testowe pod kątem martwych zwierząt oraz należy odnotować śmiertelność w odniesieniu do każdego zbiornika. Martwe zwierzęta należy usunąć ze zbiornika testowego natychmiast po ich zauważeniu. Stadium rozwojowe martwych zwierząt należy klasyfikować jako: etap poprzedzający 58. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (przed pojawieniem się kończyn przednich), etap

▼M8

między 58. i 62. stadium NF, etap między 63. i 66. stadium NF (między 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera a całkowitym zanikiem ogona), albo jako etap następujący po 66. stadium NF (stadium polarwalne). Wskaźnik śmiertelności powyżej 20 % może wskazywać na nieodpowiednie warunki badania lub nadmiernie toksyczny wpływ badanej substancji chemicznej. Zwykle zwierzęta są najbardziej podatne na śmiertelność wywołaną przez czynniki inne niż substancja chemiczna w pierwszych dniach rozwoju po tarle i w momencie kulminacyjnym przeobrażania. Tego rodzaju śmiertelność można wyraźnie wyczytać z danych dotyczących kontroli.

39. Ponadto należy rejestrować każdy przypadek nietypowego zachowania, wyraźnie widocznych wad rozwojowych (np. skoliozy) lub uszkodzeń. Należy zliczyć zaobserwowane przypadki skoliozy (częstość występowania) oraz sklasyfikować je pod względem nasilenia (np. nieznaczna – NZ, minimalna – 1, umiarkowana – 2, znaczna – 3; dodatek 8). Należy podjąć starania, aby ograniczyć częstość występowania umiarkowanej i znacznej skoliozy (np. poniżej 10 % w próbach kontrolnych) w trakcie badania, aczkolwiek większa częstość występowania nieprawidłowości w próbie kontrolnej niekoniecznie musi być powodem do zakończenia badania. Normalnie zachowujące się zwierzęta w stadium larwalnym charakteryzują się tym, że są zawieszone w słupie wody z ogonem powyżej głowy, ich płetwa ogonowa uderza regularnie i rytmicznie, okresowo wynurzają się na powierzchnię, poruszają pokrywami skrzelowymi i reagują na bodźce. Nietypowe zachowania obejmowałyby na przykład unoszenie się na powierzchni, leżenie na dnie zbiornika, pływanie brzuchem do góry lub w nieregularny sposób, brak wynurzania się na powierzchnię i brak reakcji na bodziec. W przypadku zwierząt, które już się przeobraziły, oprócz wyżej wymienionych nietypowych zachowań należy rejestrować wyraźne różnice w spożyciu pokarmu występujące między zabiegami. Wyraźnie widoczne wady rozwojowe i uszkodzenia mogą obejmować m.in. nieprawidłowości morfologiczne (np. zdeformowane kończyny), krwawiące uszkodzenia, obrzęk brzucha oraz zakażenia bakteryjne i grzybicze. Przypadki wystąpienia uszkodzeń głowy tuż za tylną krawędzią nozdrzy u osobników młodocianych mogą wskazywać na niedostateczny poziom wilgotności. Ustalenia te mają charakter jakościowy i powinno się je uważać za równoznaczne z klinicznymi objawami choroby/stresu oraz dokonywać, porównując ze zwierzętami z próby kontrolnej. Jeżeli częstotliwość występowania jest większa w zbiorniku narażonym na działanie substancji chemicznej niż w próbach kontrolnych, należy ją uznać za dowód widocznej toksyczności.

Pobieranie podpróbek osobników w stadium larwalnym

Krótki opis pobierania podpróbek osobników w stadium larwalnym

40. Kijanki, które osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, należy usunąć ze zbiorników i pobrać ich próbki albo przenieść je do następnego etapu narażenia w nowym zbiorniku lub w tym samym zbiorniku za pomocą przegrody oddzielić je od pozostałych kijanek. Kijanki kontroluje się codziennie oraz rejestruje dzień badania, w którym dany osobnik osiąga 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. Cechą charakterystyczną stosowaną w tej ocenie jest kształt głowy. Kijankę można zaliczyć do osobników, które osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, gdy rozmiar jego głowy zmniejszy się do takiego poziomu, że jej długość będzie wzrokowo porównywalna do tułowia, a kończyny przednie będą sięgać środka serca.

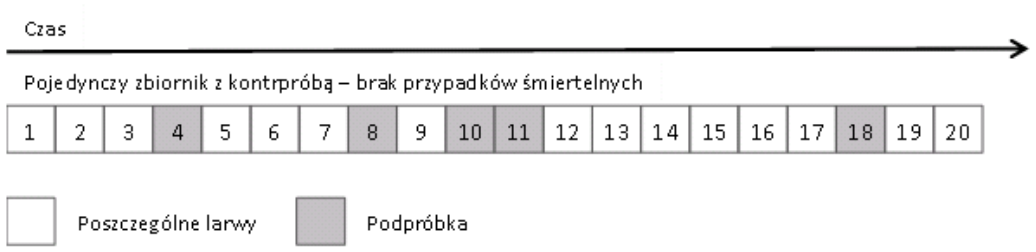
41. Celem jest, aby z każdego zbiornika z kontrpróbą pobrać pięć próbek kijanek, które osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. Działanie do należy przeprowadzić całkowicie losowo, lecz decyzję należy podjąć *a priori*. **Rys. 1** przedstawia hipotetyczny przykład zbiornika z kontrpróbą. Jeżeli w czasie, gdy pierwszy osobnik osiągnie 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, w danym zbiorniku znajdować się będzie 20 kijanek, należy wybrać pięć losowych liczb z zakresu 1–20. Kijanka o numerze 1 jest pierwszym osobnikiem, który osiągnie 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, a kijanka o numerze 20 jest ostatnim osobnikiem w zbiorniku, który osiągnie 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. Analogicznie – jeżeli w zbiorniku znajduje się 18 larw, które przeżyły, należy wybrać pięć losowych liczb z zakresu 1–18. Działanie to należy wykonać w odniesieniu do każdego zbiornika z kontrpróbą, gdy pierwszy osobnik w badaniu osiągnie 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. Jeżeli w trakcie pobierania próbek

▼M8

w 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera pojawią się przypadki śmiertelne, należy dokonać ponownego losowego doboru próbek, jako podstawę przyjmując liczbę larw, które nie osiągnęły jeszcze 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, oraz liczbę larw, których brakuje do osiągnięcia łącznej liczby pięciu próbek z tej kontrpróby. W dniu, w którym kijanka osiąga 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, sporządza się odniesienie do przygotowanego wykresu próbkowania, aby określić, czy od tego osobnika pobrano próbkę, czy też jest on fizycznie oddzielony od pozostałych kijanek w celu pozostania pod wpływem substancji chemicznej. W przedstawionym przykładzie (rys. 1) pierwszy osobnik, który osiąga 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, (tj. pole nr 1) zostaje fizycznie oddzielony od pozostałych larw, pozostaje pod wpływem substancji chemicznej i należy zarejestrować dzień, w którym dany osobnik osiągnął 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. Następnie z osobnikami o numerach 2 i 3 postępuje się w ten sam sposób, co z osobnikiem z numerem 1, a następnie od osobnika o numerze 4 pobiera się próbki do celów oceny wzrostu i histologii tarczycy (zgodnie z tym przykładem). Procedura ta trwa do momentu, w którym 20. osobnik dołącza do osobników znajdujących się na etapie następującym po 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, albo do momentu, w którym pobiera się z niego próbkę. Zastosowana losowa procedura musi zapewnić każdemu organizmowi użytemu do badania równe prawdopodobieństwo zostania wybranym. Można to osiągnąć, wykorzystując dowolną metodę randomizacji, ale również konieczne jest złapanie każdej kijanki w którymś momencie w trakcie trwania okresu pobierania podpróbek osobników, które osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera.

Rys. 1

Hipotetyczny przykład schematu pobierania próbek osobników, które osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, w odniesieniu do jednego zbiornika z kontrpróbą



42. Jeżeli chodzi o pobieranie podpróbek osobników w stadium larwalnym, uzyskiwane punkty końcowe są następujące: 1) czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (tj. liczba dni między zapłodnieniem a osiągnięciem 62. stadium NF), 2) nieprawidłowości zewnętrzne, 3) morfometria (np. masa i długość) oraz 4) histologia tarczycy.

Humanitarne uśmiercanie kijanek

43. Podpróbkę kijanek, które osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (5 osobników na kontrpróbę), należy poddać eutanazji poprzez zanurzenie na 30 minut w odpowiednich ilościach (np. 500 ml) roztworu środka znieczulającego (np. 0,3 % roztworu MS-222, metanosulfonioanu trikainy, nr CAS: 886-86-2). Roztwór MS-222 należy zbuforować wodorowęglanem sodu do pH około 7,0, ponieważ niezbuforowany roztwór MS-222 jest kwaśny i drażniący dla żabiej skóry, co powoduje słabe wchłanianie i wywołuje u tych organizmów niepotrzebny dodatkowy stres.

44. Kijanki wyjmuje się z komory badawczej za pomocą oczkowanej siatki i przenosi się do roztworu do uśmiercania (umieszcza się w roztworze do uśmiercania). Zwierzę zostało poddane eutanazji w prawidłowy sposób i jest gotowe do autopsji, gdy nie reaguje na bodźce zewnętrzne, jak np. ściskanie tylnej kończyny za pomocą szczypiec.

Morfometria (masa i długość)

45. Pomiar mokrej masy (do pełnego miligrama) oraz długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu (do 0,1 mm) w odniesieniu do każdej kijanki należy przeprowadzać niezwłocznie po tym, gdy przestanie reagować pod wpływem znieczulenia (rys. 2a). Do pomiaru długości

▼M8

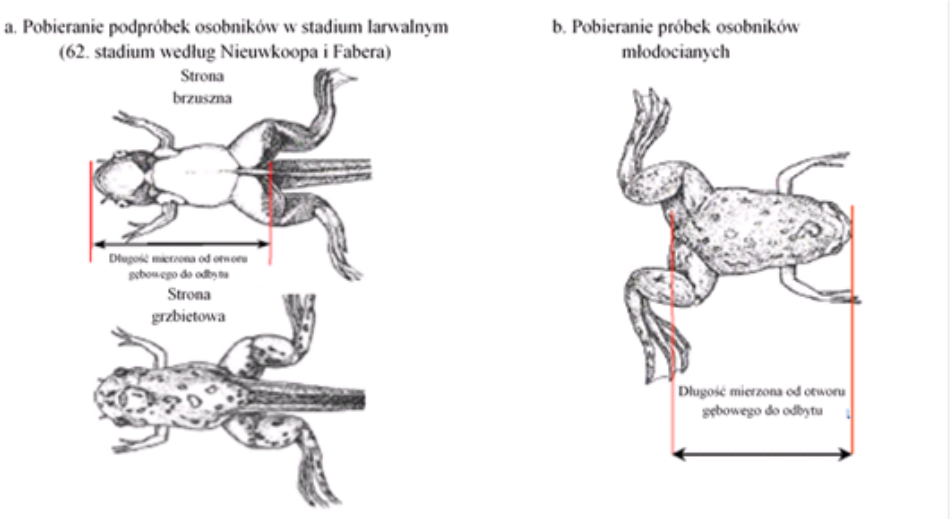
mierzonej od otworu gębowego do odbytu na podstawie zdjęcia można wykorzystać oprogramowanie przeznaczone do analizy obrazu. Przed zważeniem kijanki należy osuszać na bibule, aby usunąć nadmiar wody chroniącej ich skórę. Po dokonaniu pomiarów wielkości ciała (masy i długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu) należy zarejestrować lub odnotować wszelkie poważne nieprawidłowości morfologiczne lub kliniczne objawy toksyczności, takie jak skolioza (zob. dodatek 8), wybroczyny i krwotoki; zaleca się również prowadzenie dokumentacji cyfrowej. Należy zauważyć, że wybroczyny to małe czerwone lub fioletowe krwotoki w naczyniach włosowatych skóry.

Pobieranie tkanek i utrwalanie

46. W przypadku podpróbek osobników w stadium larwalnym przeprowadza się histologię tarczycy. Dolną część tułowia za kończynami przednimi usuwa się i wyrzuca. Oczyszczone ciało utrwala się w utrwalaczu Davidsona. Objętość utrwalacza w pojemniku powinna być co najmniej 10 razy większa niż przybliżona objętość tkanek. Aby odpowiednio utrwalić tkanki będące przedmiotem zainteresowania, należy zapewnić odpowiednie wstrząśniecie lub cyrkulację utrwalacza. Wszystkie tkanki pozostawia się w utrwalaczu Davidsona przez co najmniej 48 godzin, lecz nie dłużej niż 96 godzin; po upływie tego czasu przepłukuje się je wodą dejonizowaną i przechowuje w 10 % obojętnej buforowanej formalinie (1)(29).

Histologia tarczycy

47. Każdą podpróbkę osobników w stadium larwalnym (utrwalone tkanki) poddaje się ocenie histologicznej pod kątem gruczołów tarczycowych, tj. przeprowadza się diagnostykę i klasyfikuje się pod względem nasilenia (29)(30).



Rys. 2: Punkty wykorzystywane do pomiaru długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu na potrzeby badania LAGDA w 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (a.) oraz młodych żab (b.). Cechy charakterystyczne 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (a.): głowa jest tej samej szerokości co tułów, długość nerwu węchowego jest krótsza niż średnica opuszki węchowej (widok grzbietowy), a przednie kończyny znajdują się na wysokości serca (widok brzuszny). Rysunki na podstawie Nieuwkoopa i Fabera (1994).

Zakończenie narażenia larw

48. Biorąc pod uwagę początkową liczbę kijanek, oczekuje się, że prawdopodobnie niewielki odsetek osobników nie rozwinie się normalnie i nie zakończy przeobrażenia (66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera) w rozsądnym czasie. Część larwalna narażenia nie powinna przekraczać 70 dni. Wszystkie kijanki pozostałe po tym okresie należy poddać eutanazji

▼M8

(zob. pkt 43), zmierzyć ich mokrą masę i długość mierzoną od otworu gębowego do odbytu, określić ich stadium rozwojowe według Nieuwkoopa i Fabera, 1994, oraz odnotować wszelkie nieprawidłowości rozwojowe.

Eliminacja osobników w stadium późniejszym niż 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera

49. Po osiągnięciu 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (całkowita resorpcja ogona) dziesięć osobników powinno nadal przebywać w każdym zbiorniku do czasu zakończenia narażenia. Dlatego też po osiągnięciu przez wszystkie zwierzęta 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera lub po 70 dniach (w zależności od tego, co nastąpi wcześniej), należy przeprowadzić eliminację. Należy losowo wybrać zwierzęta w stadium późniejszym niż 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, które nie będą już poddawane narażeniu.

50. Zwierzęta, których nie wybrano do pozostania pod wpływem substancji chemicznej, poddaje się eutanazji (zob. pkt 43). W odniesieniu do każdego zwierzęcia dokonuje się pomiarów pod kątem określenia stadium rozwojowego, mokrej masy i długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu (rys. 2b), a także przeprowadza się oraz pełne rozpoznanie histopatologiczne. Płeć fenotypową (na podstawie morfologii gonad) określa się jako żeńską, męską lub nieokreśloną.

Pobieranie próbek osobników młodych

Krótki opis pobierania podpróbek osobników młodych

51. Pozostałe zwierzęta pozostają pod wpływem substancji chemicznej do czasu upłynięcia 10 tygodni po medianie czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w próbie kontrolnej z wodą rozcieńczającą (lub próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem, w stosownych przypadkach). Pod koniec okresu narażenia pozostałe zwierzęta (maksymalnie 10 żab na kontrpróbę) poddaje się eutanazji oraz dokonuje się pomiaru lub oceny oraz zapisu różnych punktów końcowych, takich jak: 1) morfometria (masa i długość), 2) fenotypowe/genetyczne proporcje płci, 3) masa wątroby (wskaźnik hepatosomatyczny), 4) histopatologia (gonady, drogi rodne, wątroba i nerki) i opcjonalnie 5) VTG w osoczu.

Humanitarne uśmiercanie żab

52. Próbki osobników młodych, tj. żab, które zakończyły etap przeobrażania, poddaje się eutanazji przez wstrzyknięcie dootrzewnowe środka znieczulającego, np. 10 % MS-222 w odpowiednim roztworze buforowanym fosforanami. Próbki pobiera się od żab po tym, gdy przestaną reagować (zwykle około 2 minut po zastrzyku, jeżeli 10 % MS-222 stosuje się w dawce 0,01 ml na gram masy żaby). Chociaż młode żaby można zanurzać w większym stężeniu środka znieczulającego (MS-222), doświadczenie pokazuje, że znieczulanie ich tą metodą trwa dłużej, a czas trwania może nie być odpowiedni, aby umożliwić pobranie próbek. Wstrzyknięcie zapewnia skuteczne, szybkie uśmiercenie przed pobraniem próbek. Pobieranie próbek należy rozpocząć dopiero po potwierdzeniu braku reakcji żab w celu upewnienia się, że zwierzęta nie żyją. Jeżeli żaby wykazują oznaki znacznego cierpienia (bardzo poważnego, a ich śmierć można wiarygodnie przewidzieć) i uznaje się je za konające, zwierzęta należy znieczulić i poddać eutanazji oraz traktować jako przypadki śmiertelne do celów analizy danych. W przypadku poddania żaby eutanazji z powodu choroby należy to odnotować i zgłosić. W zależności momentu badania, w którym żabę poddaje się eutanazji, zwierzę można zachować na potrzeby analizy histopatologicznej (utrwalając żabę na potrzeby ewentualnego badania histopatologicznego).

Morfometria (masa i długość)

53. Pomiary mokrej masy i długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu (rys. 2b) są identyczne jak te opisane w odniesieniu do pobierania podpróbek osobników w stadium larwalnym.

▼M8

VTG w osoczu (opcjonalnie)

54. VTG jest powszechnie dopuszczalnym biomarkerem, który powstaje w wyniku narażenia na działanie estrogennych substancji chemicznych. W przypadku badania LAGDA VTG w osoczu można opcjonalnie mierzyć w próbkach osobników młodych (może to być szczególnie istotne, jeżeli istnieje podejrzenie, że badana substancja chemiczna jest estrogenem).

55. Tylne kończyny uśmierconych młodych osobników odcina się, a krew pobiera się za pomocą kapilary powlekanej heparyną (choć stosowane mogą być alternatywne metody pobierania krwi, takie jak nakłucie serca). Krew przelewa się do probówki do mikrowirówki (np. 1,5 ml objętości) i odwirowuje się w celu otrzymania osocza. Próbki osocza należy przechowywać w temperaturze -70 °C lub niższej, aż do oznaczenia VTG. Stężenie VTG w osoczu można mierzyć za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA) (dodatek 6) lub metodą alternatywną, taką jak spektrometria mas (31). Ze względu na większą wrażliwość preferowane są przeciwciała specyficzne dla danego gatunku.

Określanie płci genetycznej

56. Płeć genetyczną każdej młodej żaby ocenia się na podstawie markerów opracowanych przez Yoshimoto *et al.* (11). W celu określenia płci genetycznej część (lub całość) jednej kończyny tylnej (lub innej tkanki) usuniętej w trakcie sekcji pobiera się i przechowuje w probówce do mikrowirówki (próbki tkanek pochodzące od żab można pobrać z dowolnej tkanki). Tkankę można przechowywać w temperaturze -20 °C lub niższej do momentu izolacji kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA). Izolację DNA z tkanek można przeprowadzić za pomocą zestawów dostępnych na rynku, a analizę pod kątem obecności lub braku obecności markera przeprowadza się metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) (dodatek 5). Ogólnie rzecz biorąc, zgodność między płcią histologiczną a genotypem u zwierząt z prób kontrolnych w momencie pobierania próbek od młodych osobników w grupach kontrolnych wynosi ponad 95 %.

Pobieranie tkanek i utrwalanie do celów histopatologii

57. Podczas końcowego pobierania próbek do analizy histologicznej pobiera się gonady, drogi rodne, nerki i wątrobę. Jamę brzuszną otwiera się, a wątrobę wycina się i waży. W następnej kolejności ostrożnie usuwa się organy trawienne (np. żołądek, jelita) z dolnej części brzucha w celu odsłonięcia gonad, nerek i dróg rodnych. Należy odnotować wszelkie poważne nieprawidłowości morfologiczne gonad. Na koniec należy usunąć tylne kończyny, jeśli nie usunięto ich wcześniej w celu pobrania krwi. Pobrane wątroby i tusze z gonadami pozostawionymi *in situ* należy natychmiast umieścić w utrwalaczu Davidsona. Objętość utrwalacza w pojemniku powinna być co najmniej 10 razy większa niż przybliżona objętość tkanek. Wszystkie tkanki pozostawia się w utrwalaczu Davidsona przez co najmniej 48 godzin, lecz nie dłużej niż 96 godzin; po upływie tego czasu przepłukuje się je wodą dejonizowaną i przechowuje w 10 % obojętnej buforowanej formalinie (1)(29).

Histopatologia

58. Każdą próbkę młodego osobnika poddaje się badaniu histologicznemu pod kątem zmian patologicznych gonad, dróg rodnych, nerek i wątroby, tj. przeprowadza się diagnostykę i klasyfikuje się pod względem nasilenia (32). Badanie to (np. jajnika, jądra, osobników interseksualnych) pozwala również określić fenotyp gonad, a wraz z poszczególnymi genetycznymi pomiarami płci można wykorzystać te obserwacje do obliczenia fenotypowych/genetycznych proporcji płci.

▼M8

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Analiza statystyczna

59. W badaniu LAGDA generowane są trzy rodzaje danych, które należy poddać analizie statystycznej: 1) ilościowe dane ciągłe (masa, długość mierzona od otworu gębowego do odbytu, wskaźnik hepatosomatyczny, VTG), 2) dane dotyczące czasu do wystąpienia wydarzenia w odniesieniu do tempa rozwoju (tj. dni do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera od rozpoczęcia badania) oraz 3) dane porządkowe w postaci stopnia nasilenia lub stadiów rozwojowych określonych na podstawie ocen histopatologicznych.

60. Zaleca się, aby w przypadku, gdy należy zarejestrować NOEC lub EC_x, projekt badania i wybrany test statystyczny zapewniały moc wystarczającą do wykrycia zmian o znaczeniu biologicznym w punktach końcowych. Statystyczne analizy danych (co do zasady opierające się na średnich kontrpróbach) najlepiej jest wykonywać zgodnie z procedurami opisanymi w dokumencie OECD „Aktualne podejście do statystycznej analizy danych ekotoksyczności: wytyczne stosowania" (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*)(33). Dodatek 7 do niniejszej metody badawczej zawiera zalecane drzewo decyzyjne w zakresie analizy statystycznej oraz wytyczne dotyczące przetwarzania danych i wyboru badania statystycznego lub modelu, które będą najbardziej odpowiednie do zastosowania w badaniu LAGDA.

61. Dane z pobranych próbek osobników młodych (np. wzrost, wskaźnik hepatosomatyczny) należy analizować oddzielnie dla każdej płci genetycznej, ponieważ płeć genetyczną oznacza się w odniesieniu do wszystkich żab.

Warunki analizy danych

Wykorzystanie zakłóconych kontrprób i zabiegów

62. Kontrpróby i zabiegi mogą zostać zakłócone przez nadmierną śmiertelność z powodu widocznej toksyczności, choroby lub błędu technicznego. Jeżeli zabieg jest zakłócony z powodu choroby lub błędu technicznego, do analizy dostępne powinny być trzy niezakłócone zabiegi z trzema niezakłóconymi kontrpróbami. W przypadku wystąpienia widocznej toksyczności w zabiegach z dużą zawartością substancji chemicznej zaleca się, aby do analizy dostępne były co najmniej trzy poziomy zabiegów z trzema niezakłóconymi kontrpróbami (zgodnie z podejściem opartym na maksymalnym tolerowanym stężeniu w odniesieniu do wytycznych OECD dotyczących badań (34)). Oprócz śmiertelności oznaki widocznej toksyczności mogą obejmować skutki behawioralne (np. unoszenie się na powierzchni, leżenie na dnie zbiornika, pływanie brzuchem do góry lub w nieregularny sposób, brak wynurzania się na powierzchnię), uszkodzenia morfologiczne (np. krwawiące uszkodzenia, obrzęk brzucha) lub zahamowanie normalnej reakcji żywieniowej w porównaniu jakościowym z reakcjami zwierząt z próby kontrolnej.

Próba kontrolna z rozpuszczalnikiem

63. Na zakończenie badania należy przeprowadzić ocenę potencjalnego wpływu rozpuszczalnika (jeśli wykorzystano). Dokonuje się tego, porównując statystycznie grupę kontrolną z rozpuszczalnikiem i grupę kontrolną z wodą rozcieńczającą. Najbardziej właściwe punkty końcowe, które należy uwzględnić w niniejszej analizie, to wyznaczniki wzrostu (masa i długość), ponieważ mogą na nie wpłynąć toksyczności ogólne. Jeżeli w tych punktach końcowych wykryte zostaną statystycznie istotne różnice między grupą kontrolną z wodą rozcieńczającą a grupami kontrolnymi z rozpuszczalnikiem, należy odwołać się do swojej najlepszej wiedzy fachowej, aby ustalić, czy stanowią one zagrożenie dla ważności badania. Jeżeli dwie próby kontrolne różnią się od siebie, próby poddawane działaniu substancji chemicznej należy porównać z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem, chyba że wiadomo, że najlepiej jest przeprowadzić porównanie z próbą kontrolną z wodą rozcieńczającą. Jeżeli między dwiema grupami kontrolnymi nie występuje statystycznie istotna różnica, zaleca się porównanie zabiegów, w ramach których zwierzęta poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej z pulą zabiegową (grupami kontrolnymi z rozpuszczalnikiem i z wodą rozcieńczającą), chyba że wiadomo, że najlepiej jest dokonać porównania z próbą kontrolną z wodą rozcieńczającą albo z rozpuszczalnikiem.

▼M8

Sprawozdanie z badania

64. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— właściwości fizyczne i – w stosownych przypadkach – właściwości fizykochemiczne;

— Substancja jednoskładnikowa:

wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp. (w tym, w stosownych przypadkach, zawartość węgla organicznego).

— Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), występowania ilościowego oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Badany gatunek:

— nazwa systematyczna, szczep (jeżeli jest dostępny), źródło i metoda pobierania zapłodnionych jaj i dalsze postępowanie;

— częstość występowania skoliozy w dotychczasowych próbach kontrolnych w odniesieniu do zastosowanej kultury wyjściowej.

Warunki badania:

— fotoperiod(-y);

— projekt badania (np. rozmiar komory, objętość materiału i wody, liczba komór badawczych oraz kontrprób, liczba organizmów użytych do badań na kontrpróbę);

— metoda przygotowania roztworów podstawowych i częstotliwość wymiany (jeżeli zastosowany został środek rozpuszczający, należy podać jego stężenie);

— metoda dawkowania badanej substancji chemicznej (np. pompy, układy rozcieńczające);

— wydajność odzyskowa metody i badane stężenia nominalne, granica oznaczalności, średnie wartości pomiarowych oraz ich odchylenia standardowe w naczyniach badawczych, a także metoda uzyskania takich wartości oraz dowody świadczące o tym, że pomiary odnoszą się do stężeń badanej substancji chemicznej w rzeczywistym roztworze;

— charakterystyka wody rozcieńczającej: pH, twardość, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom chloru resztkowego (jeśli dokonano pomiaru), łączna zawartość jodu, całkowity węgiel organiczny (jeśli dokonano pomiaru), zawiesina (jeśli dokonano pomiaru), zasolenie środowiska badania (jeśli dokonano pomiaru) oraz wszelkie inne wykonane pomiary;

— badane stężenia nominalne, średnie wartości pomiarowych oraz ich odchylenia standardowe;

— jakość wody w naczyniach badawczych, pH, temperatura (codziennie) i stężenie rozpuszczonego tlenu;

▼**M8**

— szczegółowe informacje dotyczące karmienia (np. rodzaj pokarmu, jego źródło, podawana ilość i częstotliwość podawania).

Wyniki:

— dowody świadczące o tym, że próby kontrolne spełniają kryteria ważności;

— dane dotyczące próby kontrolnej (oraz próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem, jeżeli jest stosowana) oraz grup poddanych zabiegowi, takie jak: zaobserwowana śmiertelność i nieprawidłowości, czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, ocena histologiczna tarczycy (tylko próbka osobników w stadium larwalnym), wzrost (masa i długość), wskaźnik hepatosomatyczny (tylko próbka osobników młodych), genetyczne/fenotypowe proporcje płci (tylko próbka osobników młodych), wyniki oceny histopatologicznej gonad, dróg rodnych, nerki i wątroby (tylko próbka osobników młodych) oraz VTG w osoczu (tylko próbka osobników młodych, jeżeli wykonano);

— metoda analizy statystycznej i przetwarzania danych (zastosowane badanie lub model statystyczny);

— stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) w odniesieniu do każdej ocenionej reakcji;

— najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), w odniesieniu do każdej ocenionej reakcji (przy $\alpha = 0{,}05$); EC_x w odniesieniu do każdej ocenianej reakcji, jeżeli dotyczy, i przedziały ufności (np. 95 %) oraz wykres dopasowanego modelu wykorzystanego do obliczeń, nachylenie krzywej zależności stężenie-odpowiedź, wzór modelu regresji, szacowane parametry modelu i ich błędy standardowe;

— wszelkie odchylenia od metody badawczej oraz odchylenia od kryteriów dopuszczalności, a także rozważania dotyczące potencjalnych konsekwencji wyniku badania.

65. W odniesieniu do wyników pomiarów punktów końcowych należy przedstawić średnie wartości oraz ich odchylenia standardowe (w miarę możliwości zarówno na podstawie kontrprób, jak i stężeń).

66. Medianę czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w próbach kontrolnych należy obliczyć i przedstawić jako średnią median kontrprób i ich odchyleń standardowych. Analogicznie – w przypadku zabiegów medianę zabiegów należy obliczyć i przedstawić jako średnią median kontrprób i ich odchyleń standardowych.

BIBLIOGRAFIA

(1) Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (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. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 150, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(3) Nieuwkoop PD i Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing Inc, Nowy Jork, NY, USA.

(4) Kloas W i 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 i 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 i Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K i 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 i 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 i 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 i 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 i 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 i 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 i 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, USA.

(17) Rozdział C.4 niniejszego załącznika, Badanie szybkiej biodegradowalności

(18) Rozdział C.29 niniejszego załącznika, Szybka biodegradowalność - CO2 w szczelnie zamkniętych naczyniach (nad roztworem).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL i 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. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 23. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ i 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, USA.

(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., 2005, 84 s.

(25) Rozdział C.38 niniejszego załącznika, Badanie przeobrażenia płazów.

(26) Rozdział C.48 niniejszego załącznika, Krótkoterminowe badanie rozrodczości ryb.

(27) Rozdział C.41 niniejszego załącznika, Badanie rozwoju płciowego ryb.

(28) Rozdział C.49 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności ostrej na rybich embrionach (FET).

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 82, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC i Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415–424.

(31) Luna LG i 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. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 228, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 54, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.

(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**

Dodatek 1

DEFINICJE

Szczytowy punkt końcowy: mający wpływ na poziomie populacji.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

ELISA: test immunoenzymatyczny.

EC_x: (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływ na organizmy użyte do badań w danym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną. Na przykład EC_{50} jest stężeniem, które według szacunków ma wpływ na punkt końcowy badania w 50 % narażonej populacji w określonym okresie narażenia.

DPZ: dni po zapłodnieniu.

Badanie przepływowe: badanie, w którym podczas narażenia trwa ciągły przepływ roztworów do badań przez układ badawczy.

Oś HPG: oś podwzgórze–przysadka–gonady.

IUPAC: Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC): najmniejsze badane stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym obserwuje się znaczące działanie toksyczne (przy $p < 0,05$) w porównaniu z próba kontrolną. Wszystkie badane stężenia powyżej LOEC powinny jednak wywierać szkodliwy skutek równy skutkom, które zaobserwowano przy LOEC, lub od nich większy. W przypadku gdy oba warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC). W dodatku 7 przedstawiono wytyczne w tym zakresie.

Mediana stężenia śmiertelnego (LC_{50}): stężenie badanej substancji chemicznej szacowane jako stężenie śmiertelne dla 50 % organizmów użytych do badań podczas trwania badania.

Stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC): badane stężenie bezpośrednio poniżej LOEC, które nie wywiera statystycznie istotnego wpływu ($p < 0,05$) w ustalonym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną.

SMILES (ang. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*): uproszczony sposób zapisu struktury chemicznej w liniowej formie tekstowej.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

VTG: witellogenina to fosfolipidoglikoproteinowy prekursor białek żółtka jajka występujący zwykle u aktywnych płciowo samic wszystkich gatunków jajorodnych.

▼**M8**

Dodatek 2

NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE DOPUSZCZALNEJ WODY ROZCIEŃCZAJĄCEJ

Substancja	Stężenie graniczne
Cząstki stałe	5 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	2 mg/l
Amoniak niejonizowany	1 µg/l
Chlor resztkowy	10 µg/l
Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych	50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli	50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	25 ng/l
Glin	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Miedź	1 µg/l
Żelazo	1 µg/l
Ołów	1 µg/l
Nikiel	1 µg/l
Cynk	1 µg/l
Kadm	100 ng/l
Rtęć	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

▼**M8**

Dodatek 3

WARUNKI BADANIA WŁAŚCIWE DLA BADANIA LAGDA

1. Badany gatunek	*Xenopus laevis*
2. Rodzaj badania	W warunkach ciągłego przepływu
3. Temperatura wody	Temperatura nominalna wynosi 21 °C. Średnia temperatura podczas badania wynosi 21 ± 1 °C (różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny przekraczać 1,0 °C).
4. Jakość oświetlenia	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum) o natężeniu oświetlenia 600–2000 luksów (lumenów/m^2) przy powierzchni wody.
5. Fotoperiod	12 godzin światła, 12 godzin bez dostępu światła.
6. Objętość roztworu do badań i naczynie badawcze (zbiornik)	4–10 l (głębokość wody co najmniej 10–15 cm). Akwarium wykonane ze szkła lub stali nierdzewnej.
7. Wymiana objętości roztworów do badań	Stała, ze względu na utrzymanie zarówno warunków biologicznych, jak i narażenia chemicznego (np. 5 wymian objętości zbiornika na dzień).
8. Początkowy wiek organizmów użytych do badań	8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Fabera.
9. Liczba organizmów na kontrpróbę	20 zwierząt (zarodków) na zbiornik (kontrpróbę) w momencie rozpoczęcia narażenia i 10 zwierząt (osobników młodych) na zbiornik (kontrpróbę) po osiągnięciu 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera aż do zakończenia narażenia.
10. Liczba zabiegów	Co najmniej 4 zabiegi z użyciem badanej substancji chemicznej oraz odpowiednie próby kontrolne.
11. Liczba kontrprób na zabieg	4 kontrpróby na zabieg poddania działaniu badanej substancji chemicznej i 8 kontrprób na potrzeby próby kontrolnej (prób kontrolnych).
12. Liczba organizmów na badane stężenie	Co najmniej 80 zwierząt na zabieg poddania działaniu badanej substancji chemicznej i co najmniej 160 zwierząt na potrzeby próby kontrolnej (prób kontrolnych).
13. Woda rozcieńczająca	Dowolna woda umożliwiająca normalny wzrost i rozwój platany szponiastej (np. woda źródlana lub woda wodociągowa przefiltrowana przez filtr węglowy).
14. Napowietrzanie	Nie jest wymagane, ale napowietrzenie zbiorników może być konieczne, jeżeli poziomy stężenia rozpuszczonego tlenu spadną poniżej zalecanych wartości granicznych, a wzrost przepływu roztworu do badań jest maksymalizowany.
15. Stężenie rozpuszczonego tlenu w roztworze do badań	Rozpuszczony tlen: wartość nasycenia powietrzem ≥ 40 % lub ≥ 3,5 mg/l.

▼**M8**

16.	pH roztworu do badań	6,5–8,5 (różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny przekraczać 0,5).
17.	Twardość i zasadowość roztworu do badań	10–250 mg $CaCO_3$/l
18.	Schemat żywienia	(Zob. dodatek 4)
19.	Okres narażenia	Od 8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Fabera do dziesięciu tygodni po medianie czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w wodzie lub grupie kontrolnej z rozpuszczalnikiem (maksymalnie 17 tygodni).
20.	Biologiczne punkty końcowe	Śmiertelność (i nietypowy wygląd), czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (próbka osobników w stadium larwalnym), ocena histologiczna tarczycy (próbka osobników w stadium larwalnym), wzrost (masa i długość), wskaźnik hepatosomatyczny (próbka osobników młodych), genetyczne/fenotypowe proporcje płci (próbka osobników młodych), badanie histopatologiczne gonad, dróg rodnych, nerek i wątroby (próbka osobników młodych) oraz witellogenina w osoczu (w próbce osobników młodych, opcjonalnie).
21.	Kryteria ważności badania	Stężenie rozpuszczonego tlenu powinno zapewniać wartość nasycenia powietrzem na poziomie > 40 %; średnia temperatura wody powinna wynosić 21 ± 1 °C, a różnice między kontrpróbami i między zabiegami powinny wynosić <1,0°C; pH roztworu do badań powinno mieścić się w zakresie 6,5–8,5; śmiertelność w grupie kontrolnej powinna wynosić ≤ 20 % w każdej kontrpróbie, a średni czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w grupie kontrolnej powinien wynosić ≤ 45 dni; średnia masa organizmów użytych do badań w 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera i na zakończenie testu w próbach kontrolnych i próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem (jeżeli są stosowane) powinna wynosić odpowiednio 1,0 ± 0,2 i 11,5 ± 3 g. powinny być dostępne dowody pozwalające wykazać, że stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze utrzymano w granicach ± 20 % średnich wartości pomiarowych.

▼M8

Dodatek 4

SCHEMAT ŻYWIENIA

Należy zaznaczyć, że mimo iż zaleca się stosować niniejszy schemat żywienia, dopuszcza się stosowanie metod alternatywnych, pod warunkiem że organizmy użyte do badań rosną i rozwijają się w odpowiednim tempie.

Karmienie osobników w stadium larwalnym

Przygotowanie diety larw

A. 1:1 (obj.) pokarmu dla młodych pstrągów: glony / TetraFin® (lub równoważnik);

1. Pokarm dla młodych pstrągów: 50 g pokarmu dla młodych pstrągów (drobnych granulek lub proszku) należy blendować z 300 ml odpowiedniej, przefiltrowanej wody na wysokich obrotach przez 20 sekund.

2. Glony / mieszanka TetraFin® (lub równoważnik): 12 g spiruliny w tabletkach należy blendować z 500 ml przefiltrowanej wody na wysokich obrotach przez 40 sekund, 12 g karmy TetraFin® (lub równoważnika) blendować z 500 ml przefiltrowanej wody, a następnie połączyć te dwie mieszaniny, aby uzyskać 1 l spiruliny o stężeniu 12 g/l i TetraFin® (lub równoważnika) o stężeniu 12 g/l.

3. Należy połączyć równe objętości zblendowanego pokarmu dla młodych pstrągów i glonów / mieszaniny TetraFin® (lub równoważnika).

B. Solowce:

15 ml jaj solowców wylęga się w 1 l słonej wody (przygotowanej przez dodanie 20 ml NaCl do 1 l wody dejonizowanej). Po napowietrzaniu przez 24 godziny w temperaturze pokojowej przy stałym świetle solowce pobiera się. Zatrzymując napowietrzenie, pozawala się solowcom krótkotrwale odstać przez 30 minut. Cysty, które wypłyną na powierzchnię pojemnika, odlewa się i usuwa, a solowce przelewa się przez odpowiednie filtry i uzupełnia do 30 ml przefiltrowaną wodą.

Protokół karmienia

W tabeli 1 podano dane referencyjne dotyczące rodzaju i ilości pokarmu stosowanego na etapie narażenia osobników w stadiach larwalnych Zwierzęta należy karmić trzy razy dziennie od poniedziałku do piątku i raz dziennie w weekendy.

Tabela 1

Schemat żywienia larw platany szponiastej w warunkach przepływu

Czas (*) (po zapłodnieniu)	Pokarm dla młodych pstrągów: glony/TetraFin® (lub równoważnik)		Solowce	
	Dzień roboczy (3 razy dziennie)	Weekend (1 raz dziennie)	Dzień roboczy (dwa razy dziennie)	Weekend (1 raz dziennie)
Dni 4-14 (w tygodniach 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (od dnia 8 do 15) 1 ml (od dnia 16)	0,5 ml (od dnia 8 do 15) 1 ml (od dnia 16)
Tydzień 2	0,67 ml	2,4 ml		
Tydzień 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Tydzień 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Tydzień 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Czas (*) (po zapłodnieniu)	Pokarm dla młodych pstrągów: glony/TetraFin® (lub równoważnik)		Solowce	
	Dzień roboczy (3 razy dziennie)	Weekend (1 raz dziennie)	Dzień roboczy (dwa razy dziennie)	Weekend (1 raz dziennie)
Tydzień 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Tydzień 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Tygodnie 8-1	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Dzień 0 oznacza dzień wykonania zastrzyku z hCG.

Przejście z pokarmu dla larw na pokarm dla osobników młodych

Po całkowitym przeobrażeniu larwy przechodzą na dietę dla osobników młodych opracowywaną zgodnie z poniższym opisem. W czasie tego przejścia należy zmniejszać ilość pokarmu dla larw i zwiększać ilość pokarmu dla osobników młodych. Można to przeprowadzić, stopniowo zmniejszając ilość pokarmu dla larw, jednocześnie stopniowo zwiększając ilość pokarmu dla osobników młodych, gdy każda z grup pięciu kijanek ukończy 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera oraz zbliży się do ukończenia przeobrażenia w 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera.

Karmienie osobników młodych

Dieta osobników młodych

Po zakończeniu procesu przeobrażania (w 66. stadium) schemat żywienia zmienia się i zwierzętom podaje się wyłącznie wysokiej jakości opadający na dno pokarm dla żab o rozmiarze 3/32 cala (Xenopus Express™, Floryda, Stany Zjednoczone) lub równoważny.

Przygotowywanie pokruszonego granulatu do stosowania w okresie przejścia ze stadium larwalnego do stadium młodocianego

Granulki opadającego na dno pokarmu dla żab przez krótki czas rozdrabnia się w młynku do kawy, blenderze lub kruszy za pomocą moździerza i tłuczka w celu zmniejszenia rozmiaru granulek o około 1/3. Nie zaleca się zbyt długiego przetwarzania, ponieważ prowadzi to do powstania proszku.

Protokół karmienia

W **tabeli 2** podano dane referencyjne dotyczące rodzaju i ilości paszy stosowanej w młodocianym i dorosłym stadium rozwoju. Zwierzęta należy karmić raz dziennie. Należy zaznaczyć, że w okresie przeobrażenia zwierzęta nadal otrzymują porcję solowców aż do momentu, w którym >95 % zwierząt zakończy przeobrażanie.

Zwierząt nie należy karmić w dniu zakończenia badania, aby pasza nie zakłócała pomiarów masy.

Tabela 2

Schemat żywienia młodych osobników platany szponiastej w warunkach przepływu. Należy zaznaczyć, że nieprzeobrażone zwierzęta, w tym te, których przeobrażenie zostało opóźnione w wyniku poddania działaniu substancji chemicznej, nie potrafią jeść niepokruszonego granulatu

Czas (*) (tygodnie po medianie daty przeobrażenia)	Pokruszony granulat (mg na młodą żabę)	Niepokruszony granulat (mg na młodą żabę)
W momencie zakończenia przeobrażenia	25	0
Tygodnie 0-1	25	28

▼**M8**

Czas (*) (tygodnie po medianie daty przeobrażenia)	Pokruszony granulat (mg na młodą żabę)	Niepokruszony granulat (mg na młodą żabę)
Tygodnie 2-3	0	110
Tygodnie 4-5	0	165
Tygodnie 6-9	0	220

(*) Pierwszy dzień tygodnia 0 oznacza medianę daty przeobrażenia zwierząt z próby kontrolnej.

▼M8

Dodatek 5

OKREŚLANIE PŁCI GENETYCZNEJ

Metoda określania płci genetycznej platany szponiastej opiera się na metodzie opisanej przez Yoshimoto *et al.* 2008. W razie potrzeby ze szczegółowymi procedurami dotyczącymi typowania genetycznego można się zapoznać w tej publikacji. Można korzystać z metod alternatywnych (np. łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym o wysokiej przepustowości), jeżeli okażą się odpowiednie.

Startery platany szponiastej

Marker DM-W

Sensowny: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Antysensowny: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Kontrola dodatnia

Sensowny: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Antysensowny: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Oczyszczanie DNA

Należy oczyścić DNA z tkanki mięśniowej lub skóry, używając np. Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (o numerze katalogowym 69 506) lub podobnego produktu zgodnie z instrukcjami dołączonymi do zestawu. W przypadku gdy jest to konieczne do PCR, DNA można wymywać z kolumn typu spin, używając mniejszej ilości roztworu buforowego, aby otrzymać próbki o wyższym stężeniu. Należy zauważyć, że DNA jest dosyć stabilne, dlatego trzeba zachować ostrożność, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia krzyżowego, które mogłoby prowadzić do błędnej charakterystyki samców jako samic lub odwrotnie.

PCR

Przykładowy protokół dotyczący stosowania JumpStart™ *Taq* firmy Sigma przedstawiono w **tabeli 1**.

Tabela 1

Przykładowy protokół dotyczący stosowania JumpStart™ *Taq* firmy Sigma

Mieszanina główna	1x (µl)	[stężenie końcowe]
Woda wolna od nukleaz (NFW) (*)	11	—
10X roztwór buforowy	2,0	—
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
Deoksynukleotydy (dNTP) (10 mM każdy)	0,4	200 µM
Marker startera (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marker startera antysensownego (8 µM)	0,8	0,3 µM
Próba kontrolna startera (8 µM)	0,8	0,3 µM
Próba kontrolna startera antysensownego (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 jednostek/µl
Wzorzec DNA	1,0	~200 pg/µl

(*) Woda wolna od nukleaz (NFW)
Uwaga: należy przygotować większą ilość mieszaniny głównej, aby uwzględnić straty, które mogą nastąpić podczas pipetowania (np. 25x można wykorzystać jedynie do 24 reakcji).

▼**M8**

Reakcja:

Mieszanina główna	19,0 µl
Wzorzec	1,0 µl
Ogółem	20,0 µl

Charakterystyka termocyklera:

Krok 1.	94 °C	1 minuta
Krok 2.	94 °C	30 sekund
Krok 3.	60 °C	30 sekund
Krok 4.	72 °C	1 minuta
Krok 5.	Zob. krok 2.	35 cykli
Krok 6.	72 °C	1 minuta
Krok 7.	4 °C	utrzymać

Produkty powstałe w wyniku PCR można od razu wykorzystać w żelu lub przechowywać w temperaturze 4 °C.

Elektroforeza w żelu agarozowym (3 %) (przykładowy protokół)

50X TAE

Tris	24,2 g
Kwas octowy lodowaty	5,71 ml
Na_2 (EDTA) $2H_2O$	3,72 g

Dodać wodę do uzyskania 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 agarozy

3 części agarozy NuSieve™ GTG™

1 część agarozy Fishera o niskiej elektroosmozie

Metoda

1. Przygotować 3 % żel, dodając 1,2 g mieszanki agarozy do 43 ml 1X TAE. Mieszać do rozpadu dużych grudek.

2. Podgrzewać mieszaninę agarozy w kuchence mikrofalowej do całkowitego rozpuszczenia (unikając wykipienia). Zostawić, aby trochę ostygła.

3. Dodać 1,0 µl bromku etydyny (10 mg/ml). Zamieszać kolbą. Należy zauważyć, że bromek etydyny jest mutagenny, więc w tym kroku – w miarę istnienia technicznych możliwości – należy stosować alternatywne substancje chemiczne, aby zminimalizować zagrożenie dla zdrowia pracowników ([1]).

4. Wlać żel do formy przy użyciu grzebienia. Ostudzić całkowicie.

([1]) Zgodnie z art. 4 ust. 1 dyrektywy 2004/37/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie ochrony pracowników przed zagrożeniem dotyczącym narażenia na działanie czynników rakotwórczych lub mutagenów podczas pracy (szósta dyrektywa szczegółowa w rozumieniu art. 16 ust. 1 dyrektywy Rady 89/391/EWG) (Dz.U. L 158 z 30.4.2004, s. 50).

▼**M8**

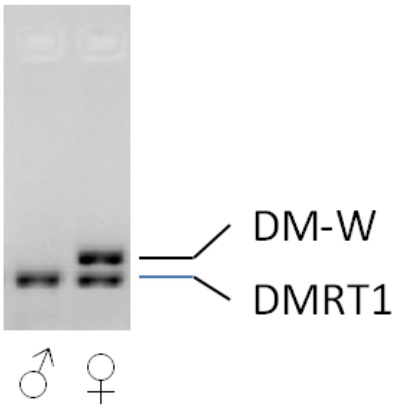
5. Nanieść żel na aparaturę. Przykryć żel 1X TAE.

6. Dodać 1 µl 6x barwnika do nanoszenia do każdych 10 µl produktu powstałego w wyniku PCR.

7. Przenieść próbki do dołków za pomocą pipety.

8. Włączyć aparaturę przy stałym napięciu 160 woltów na ~20 minut.

   Obraz żelu agarozowego pokazującego wzory prążków charakterystycznych dla osobników płci męskiej i żeńskiej przedstawiono na **rys. 1**.



Rys. 1: Obraz żelu agarozowego pokazujący wzór prążków charakterystycznych dla osobników płci męskiej (♂) (pojedyncze pasmo ~203 pz: DMRT1) i żeńskiej (♀) (dwa prążki ~259 pz: DM-W i 203 pz: DMRT1)

BIBLIOGRAFIA

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

Dodatek 6

POMIAR WITELLOGENINY

Pomiaru witellogeniny (VTG) dokonuje się przy użyciu metody wykorzystującej test immunoenzymatyczny (ELISA), którą początkowo opracowano dla VTG strzebli wielkogłowej (Parks *et al.*, 1999). Obecnie na rynku nie ma dostępnych przeciwciał dla platany szponiastej. Biorąc pod uwagę bogactwo informacji na temat tego białka i dostępność opłacalnych usług w zakresie komercyjnej produkcji przeciwciał, rozsądne wydaje się jednak, że laboratoria mogą łatwo opracować test ELISA w celu dokonanie tego pomiaru (Olmstead *et al.*, 2009). Olmstead *et al.* (2009) podają również opis testu zmodyfikowanego pod kątem VTG u afrykańskiej żaby szponiastej, jak podano poniżej. W metodzie tej wykorzystuje się przeciwciało anty-VTG afrykańskiej żaby szponiastej, ale wiadomo, że działa ono również na VTG platany szponiastej. Należy zaznaczyć, że można również stosować niekompetycyjne testy ELISA oraz że mogą one posiadać niższe granice wykrywalności niż metoda opisana poniżej.

Materiały i odczynniki

— preadsorbowana surowica zawierająca przeciwciała pierwszorzędowe

— Zmieszać 1 część surowicy zawierającej przeciwciała pierwszorzędowe anty-VTG afrykańskiej żaby szponiastej z 2 częściami osocza pobranego od samca z próby kontrolnej i pozostawić w temperaturze pokojowej na ~75 minut, położyć na lodzie na 30 minut, odwirować przy >20K × G przez 1 godzinę w temperaturze 4 °C, usunąć supernatant, podzielić na podwielokrotności, przechowywać w temperaturze -20 °C.

— przeciwciała drugorzędowe

— koniugat kozi antykróliczy IgG-HRP (np. Bio-Rad 172–1019)

— wzorzec VTG

— oczyszczona VTG platany szponiastej o stężeniu 3,3 mg/ml

— TMB (3,3',5,5' tetrametylobenzydyna) (np. KPL 50-76-00 lub Sigma T0440)

— normalna surowica kozia (NGS)(np. Chemicon® S26-100 ml)

— 96-dołkowe polistyrenowe mikropłytki do testów immunoenzymatycznych (np. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)

— cieplarka laboratoryjna do płytek utrzymująca temperaturę 37 °C (lub szybko odzyskujący równowagę inkubator powietrzny), łaźnia wodna do probówek

— pozostały zwykły sprzęt laboratoryjny, substancje chemiczne i materiały

Receptury

Roztwór buforowy opłaszczający (50 mM bufora węglanowego, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
woda	428 ml

10X PBS (0,1 M fosforanu, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
woda	810 ml

▼**M8**

Roztwór buforowy do przemywania (PBST):

10X PBS	100 ml
woda	900 ml

Wyregulować pH do 7,3 za pomocą 1 M HCI, a następnie dodać 0,5 ml Tween-20.

Bufor testowy:

normalna surowica kozia (NGS)	3,75 ml
Roztwór buforowy do przemywania	146,25 ml

Pobieranie próbek

Krew pobiera się przy pomocy kapilary mikrohematokrytowej powlekanej heparyną, którą umieszcza się na lodzie. Po odwirowaniu przez 3 minuty kapilarę ocenia się, otwiera, a osocze przelewa się do probówek do mikrowirówki o pojemności 0,6 ml, które zawierają 0,13 jednostki liofilizowanej aprotyniny (probówki te przygotowuje się z wyprzedzeniem, dodając odpowiednią ilość aprotyniny, zamrażając i liofilizując w wirówce, w niskiej temperaturze, aż do wyschnięcia). Osocze należy przechowywać w temperaturze -80 °C do momentu poddania go analizie.

Procedura dla jednej płytki

Powlekanie płytki

Zmieszać 20 µl oczyszczonego VTG z 22 ml bufora węglanowego (stężenie końcowe: 3 µg/ml). Dodać 200 µl roztworu do każdego dołka na płytce 96-dołkowej. Pokryć płytkę samoprzylepną folią uszczelniającą i pozostawić do inkubacji w temperaturze 37 °C przez 2 godziny (lub w temperaturze 4 °C przez noc).

Blokowanie płytki

Roztwór blokujący przygotowuje się, dodając 2 ml normalnej surowicy koziej do 38 ml bufora węglanowego. Usunąć roztwór powlekający i otrząsnąć do sucha. Dodać 350 µl roztworu blokującego do każdego dołka. Pokryć płytkę samoprzylepną folią uszczelniającą i pozostawić do inkubacji w temperaturze 37 °C przez 2 godziny (lub w temperaturze 4 °C przez noc).

Przygotowanie wzorców

5,8 µl wzorca oczyszczonej VTG wymieszać z 1,5 ml bufora testowego w jednorazowej szklanej probówce borokrzemowej o wymiarach 12 x 75 mm. Uzyskane stężenie wznosi 12 760 ng/ml. Następnie tworzy się serię rozcieńczeń w postępie geometrycznym, dodając 750 µl poprzedniego rozcieńczenia do 750 µl bufora testowego, aby uzyskać stężenia końcowe wynoszące 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 i 50 ng/ml.

Przygotowanie próbek

Rozpocząć od rozcieńczenia osocza w buforze testowym w stosunku 1:300 (np. połączyć 1 µl osocza z 299 µl bufora testowego) lub 1:30. Jeżeli oczekuje się dużej ilości VTG, konieczne może być przygotowanie dodatkowych roztworów lub roztworów bardziej rozcieńczonych. Należy dążyć do utrzymania wartości B/B_o w zakresie wzorców. W przypadku próbek, w których ilość VTG nie jest znaczna, np. u samców i samic w próbie kontrolnej (z których wszystkie są niedojrzałe), należy stosować roztwór o stosunku 1:30. W roztworach rozcieńczonych w mniejszym stopniu niż określono powyżej mogą pojawiać się niepożądane wpływy matrycy.

Ponadto zaleca się przeprowadzenie analizy próby kontrolnej dodatniej w odniesieniu do każdej płytki. Próba ta pochodzi z puli osocza zawierającego wysoko indukowane poziomy VTG. Pulę tę najpierw rozcieńcza się w normalnej surowicy koziej, dzieli na podwielokrotności i przechowuje w temperaturze -80 °C. Dla każdej płytki podwielokrotność rozmraża się, jeszcze bardziej rozcieńcza w buforze testowym i analizuje podobnie jak próbkę testową.

▼M8

Inkubacja z przeciwciałami pierwszorzędowymi

Przeciwciała pierwszorzędowe przygotowuje się, rozpuszczając preadsorbowaną surowicę zawierającą przeciwciała pierwszorzędowe w buforze testowym w stosunku 1:2000 (np. 8 µl do 16 ml bufora testowego). 300 µl roztworu zawierającego przeciwciała pierwszorzędowe należy połączyć z 300 µl próbki/wzorca w szklanej probówce. Probówkę B_o przygotowuje się podobnie – przy użyciu 300 µl bufora testowego oraz 300 µl przeciwciał. Należy także przygotować probówkę z NSB, korzystając wyłącznie z 600 µl bufora testowego, czyli bez przeciwciał. Przykryć probówki folią uszczelniającą i delikatnie wymieszać w wirówce. Pozostawić do inkubacji w temperaturze 37 °C przez 1 godzinę.

Mycie płytki

Umyć płytkę tuż przed zakończeniem inkubacji przeciwciała pierwszorzędowego. Odbywa się to poprzez wytrząśnięcie zawartości i osuszenie na chłonnym papierze. Następnie dołki należy wypełnić 350 µl roztworu do mycia, opróżnić i osuszyć. Przydatna jest tu automatyczna pipeta wielokanałowa lub płuczka do płytek. Etap mycia powtarza się jeszcze dwukrotnie, czyli łącznie płytki myje się trzykrotnie.

Zapełnianie płytki

Po umyciu płytki probówki należy wyjąć z łaźni wodnej i lekko odwirować. Dodać 200 µl z każdej próbki, wzorca, B_o oraz probówki z NSB do zduplikowanych dołków na płytce. Płytkę należy pokryć samoprzylepną folią uszczelniającą i pozostawić do inkubacji w temperaturze 37 °C przez 1 godzinę.

Inkubacja z przeciwciałami drugorzędowymi

Po zakończeniu inkubacji, która ma miejsce na poprzednim etapie, płytkę należy ponownie trzykrotnie przemyć w sposób opisany powyżej. Rozcieńczony roztwór przeciwciał drugorzędowych przygotowuje się, mieszając 2,5 µl przeciwciał drugorzędowych z 50 ml bufora testowego. Do każdego dołka należy dodać 200 µl rozcieńczonego roztworu przeciwciał drugorzędowych, uszczelnić jak opisano wyżej i pozostawić do inkubacji przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C.

Dodanie substratu

Po zakończeniu inkubacji z przeciwciałami drugorzędowymi należy przemyć płytkę trzykrotnie w sposób opisany powyżej. Do każdego dołka należy dodać 100 µl substratu TMB. Należy umożliwić zajście reakcji przez 10 minut, najlepiej przy słabym oświetleniu. Reakcję należy zatrzymać, dodając 100 µl 1 M kwasu fosforowego. W wyniku tego działania barwa zmieni się z niebieskiej na intensywnie żółtą. Należy zmierzyć absorbancję przy 450 nm, korzystając z czytnika płytek.

Obliczanie B/B_o

Należy odjąć średnią wartość NSB od wszystkich pomiarów. Wartość B/B_o dla każdej próbki i wzorca oblicza się, dzieląc wartość absorbancji (B) przez średnią absorbancję próbki B_o.

Uzyskiwanie krzywej wzorcowej i określenie nieznanych ilości

Przy pomocy oprogramowania do tworzenia wykresów (np. Slidewrite™ lub Sigma Plot®) należy wygenerować krzywą wzorcową, która dokona ekstrapolacji ilości z B/B_o próbki w oparciu o B/B_o wzorca. Zazwyczaj ilość jest wykreślana na skali logarytmicznej, a krzywa ma kształt sigmoidalny. W przypadku stosowania wąskiego zakresu wzorców może jednak wydawać się, że wykres jest liniowy. Należy skorygować ilości próbek o współczynnik rozcieńczenia i podać jako mg VTG/ml osocza.

Określenie minimalnych granic wykrywalności

Sposób raportowania wyników z niskich wartości często nie jest jasny, szczególnie w przypadku normalnych samców. W takich przypadkach do określenia, czy wartość należy zarejestrować jako zero, czy też jako inną liczbę, należy wykorzystać 95 % granice ufności. Jeżeli wynik próbki mieści się w przedziale ufności wzorca zerowego (B_o), wynik należy zgłosić jako zero. Minimalny

▼**M8**

poziom wykrywalności będzie najniższym wzorcem, konsekwentnie odbiegającym od wzorca zerowego; oznacza to, że dwa przedziały ufności nie pokrywają się. W odniesieniu do każdego wyniku próbki, który mieści się w granicach ufności dla minimalnego poziomu wykrywalności lub jest od niego wyższy, rejestruje się obliczoną wartość. Jeżeli próbka mieści się w przedziale między wzorcem zerowym a przedziałami ufności minimalnego poziomu wykrywalności, należy podać połowę minimalnego poziomu wykrywalności dla wartości tej próbki.

BIBLIOGRAFIA

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

Dodatek 7

ANALIZA STATYSTYCZNA

W badaniu LAGDA generowane są trzy rodzaje danych, które należy poddać analizie statystycznej: 1) ilościowe dane ciągłe, 2) dane dotyczące czasu do wystąpienia wydarzenia w odniesieniu do tempa rozwoju (czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera) oraz 3) dane porządkowe w postaci stopnia nasilenia lub stadiów rozwojowych określonych na podstawie ocen histopatologicznych. Zalecane drzewo decyzyjne analizy statystycznej na potrzeby badania LAGDA przedstawiono na wykresie 1. Poniżej przedstawiono również niektóre adnotacje, które mogą być potrzebne do przeprowadzenia analizy statystycznej pomiarów uzyskanych w wyniku badania LAGDA. W przypadku drzewa decyzyjnego wyniki pomiarów w odniesieniu do śmiertelności, wzrostu (masa i długość) oraz wskaźnika hepatosomatycznego (LSI) należy analizować zgodnie z gałęzią „inne punkty końcowe”.

Dane ciągłe

Dane dotyczące ciągłych punktów końcowych należy najpierw sprawdzić pod kątem monotoniczności poprzez przekształcenie danych w rankingu, dopasowanie do modelu ANOVA oraz porównanie kontrastów liniowych i kwadratowych. Jeżeli dane są monotoniczne, należy wykonać regresyjny test trendu Jonckheere'a-Terpstry na medianach kontrprób i nie należy stosować żadnych dalszych analiz. Metodą alternatywną pozyskiwania danych, które są zwykle rozprowadzane z jednorodnymi wariancjami, jest regresyjny test Williamsa. Jeżeli dane są niemonotoniczne (kontrast kwadratowy jest znaczący, a liniowy nie jest znaczący), należy je analizować przy użyciu modelu mieszanego ANOVA. Dane należy następnie ocenić pod kątem normalności (preferuje się stosowanie testu Shapiro-Wilka lub testu Andersona-Darlinga) i jednorodności wariancji (preferuje się stosowanie testu Levene'a). Oba testy przeprowadza się na resztach modelu mieszanego ANOVA. Zamiast tych formalnych badań normalności i jednorodności wariancji można oprzeć się na swojej najlepszej wiedzy, jednak preferowane są badania formalne Jeżeli dane mają rozkład normalny o jednorodnej wariancji, wówczas założenia modelu mieszanego ANOVA uznaje się za spełnione, a istotny wynik zabiegu określa się na podstawie testu Dunnetta. W przypadku stwierdzenia odchylenia od normy lub niejednorodności wariancji naruszane są założenia Dunnetta i należy dążyć do transformacji normalizującej i stabilizującej wariancję Jeśli taka transformacja nie zostanie wykryta, wówczas istotny wynik zabiegu jest określany na podstawie testu Dunna. Gdy tylko to możliwe, analizę dwuczynnikową należy zastąpić analizą jednoczynnikową, jednak określenie, która z nich jest odpowiednia dla danego punktu końcowego, wymaga profesjonalnego osądu.

Śmiertelność

Dane dotyczące śmiertelności należy analizować w odniesieniu do całego okresu badania i należy wyrazić je jako odsetek padnięć w danym zbiorniku. Liczby kijanek, które w danym okresie nie dokończą przeobrażenia, kijanek, które znajdują się w kohorcie podpróbek osobników w stadium larwalnym, młodych żab, które zostają wyeliminowane, oraz wszystkich zwierząt, które umierają z powodu błędu eksperymentatora, należy traktować jako dane cenzurowane i nie należy uwzględniać ich w mianowniku obliczenia procentowego. Przed przystąpieniem do jakichkolwiek analiz statystycznych należy przekształcić odsetek upadkowości w pierwiastek kwadratowy arcsin. Metodą alternatywną będzie regresyjny test Cochrana-Armitage'a, ewentualnie z korektą Rao-Scotta w przypadku nadmiernego rozproszenia.

Masa i długość (dane dotyczące wzrostu)

W czasie przeobrażenia samce i samice nie wykazują dymorfizmu płciowego, dlatego analiza danych dotyczących wzrostu na podstawie pobranych podpróbek osobników w stadium larwalnym powinna być niezależna od płci. Dane dotyczące wzrostu osobników młodych powinny jednak podlegać oddzielnej analizie na podstawie płci genetycznej. W przypadku tych punktów końcowych konieczne może okazać się uwzględnienie przekształcenia logarytmicznego, ponieważ naturalny logarytm danych dotyczących wielkości nie jest rzadkością.

▼**M8**

Wskaźnik hepatosomatyczny (LSI)

Wagę wątroby należy znormalizować w stosunku do masy całego ciała (tj. LSI) i analizować oddzielnie na podstawie płci genetycznej.

Czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera

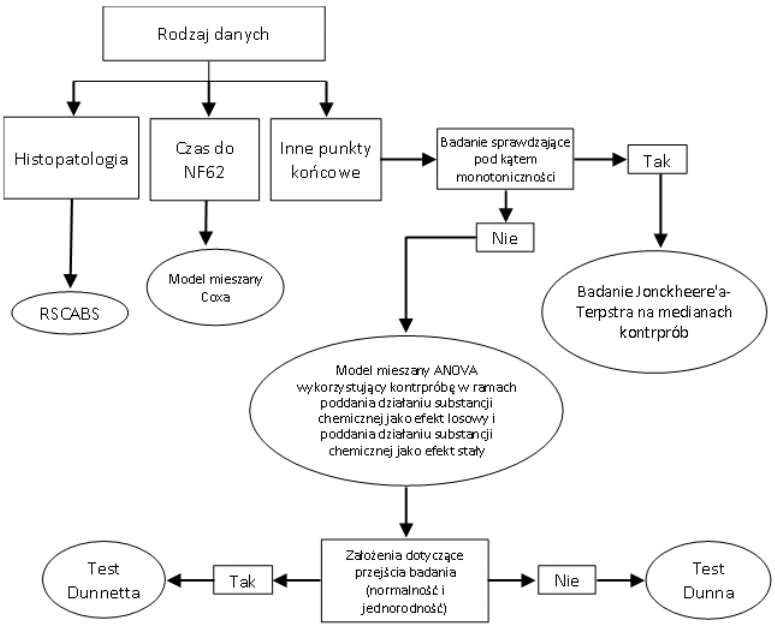
Dane dotyczące czasu potrzebnego do przeobrażenia należy traktować jako dane dotyczące czasu do wystąpienia zdarzenia, przy czym dane dotyczące śmiertelności lub osobników, które nie osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w ciągu 70 dni, należy traktować jako dane ucięte prawostronnie (tzn. rzeczywista wartość jest większa niż 70 dni, ale badanie kończy się przed osiągnięciem 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w ciągu 70 dni). Do określenia daty zakończenia badania należy wykorzystać medianę czasu potrzebnego do zakończenia przeobrażenia w 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w próbie kontrolnej z wodą rozcieńczającą. Medianę czasu potrzebnego do zakończenia przeobrażenia można określić za pomocą estymatorów Kaplana-Meiera. Ten punkt końcowy należy analizować przy użyciu modelu mieszanego proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem struktury kontrprób badania.

Dane histopatologiczne (stopnie nasilenia i stadia rozwojowe)

Dane histopatologiczne prezentowane są w postaci stopni nasilenia lub stadiów rozwojowych. W teście RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) wykorzystuje się regresyjny test trendu Cochrana-Armitage'a z korektą Rao-Scotta na każdym poziomie skali nasilenia objawów w reakcji histopatologicznej (Green *et al.*, 2014). Korekta Rao-Scotta wprowadza do testu plan doświadczalny naczyń z kontrpróbą. Procedura „by Slices" uwzględnia przewidywanie biologiczne, że stopień nasilenia objawów zazwyczaj rośnie wraz z rosnącym badanym stężeniem lub dawką, przy jednoczesnym zachowaniu indywidualnych wyników i ujawnieniu nasilenia każdego stwierdzonego efektu. Procedura RSCABS nie tylko określa, które zabiegi odbiegają statystycznie od kontroli (tj. wykazują większe nasilenie zmian patologicznych niż kontrole), ale także, przy jakim stopniu dotkliwości występuje rozbieżność, tym samym nadając analizie bardzo potrzebny kontekst. W przypadku stadiów rozwojowych gonad i dróg rodnych należy zastosować dodatkową manipulację danymi, ponieważ RSCABS zakłada, że nasilenie skutków wzrasta wraz z dawką. Obserwowanym skutkiem może być opóźnienie lub przyspieszenie rozwoju. Dlatego też dane dotyczące etapów rozwoju powinny być analizowane w taki sposób, w jaki zostały zgłoszone w celu wykrycia przyspieszenia rozwoju, a następnie przed drugą analizą poddane inwersji manualnej w celu wykrycia opóźnienia w rozwoju.

Rys. 1

Drzewo decyzyjne dot. analizy statystycznej danych LAGDA



▼**M8**

BIBLIOGRAFIA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108-1 116.

▼M8

Dodatek 8

KWESTIE DOTYCZĄCE ŚLEDZENIA PRZEBIEGU I MINIMALIZOWANIA PRZYPADKÓW WYSTĘPOWANIA SKOLIOZY

Skolioza idiopatyczna, objawiająca się zwykle jako zgięty ogon u kijanek platany szponiastej, może utrudniać obserwacje morfologiczne i behawioralne w populacjach poddawanych badaniu. Należy dołożyć starań, aby zminimalizować częstość występowania skoliozy lub całkowicie ją wyeliminować, zarówno w stadzie, jak i w warunkach badania. Zaleca się, aby w badaniu ostatecznym częstość występowania umiarkowanej i ciężkiej skoliozy była mniejsza niż 10 % w celu zwiększenia ufności, że badanie może wykryć związane z zabiegem skutki rozwojowe u zdrowych larw płazów.

W ramach codziennych obserwacji podczas badania ostatecznego należy rejestrować zarówno częstość występowania (indywidualna liczba), jak i nasilenie skoliozy, o ile występuje. Charakter nieprawidłowości należy opisać w odniesieniu do miejsca występowania (np. powyżej lub poniżej odbytu) i kierunku krzywizny (np. boczna lub grzbietobrzuszna). Stopień nasilenia można określić w następujący sposób:

(NZ): nieznaczny: nie zaobserwowano krzywizny;

1) minimalny: nieznaczna boczna krzywizna poniżej odbytu; widoczna tylko w stanie spoczynku;

2) umiarkowany: boczna krzywizna poniżej odbytu; widoczna przez cały czas, ale nie utrudnia ruchu;

3) znaczna: boczna krzywizna powyżej odbytu; LUB dowolna krzywizna utrudniająca ruch; LUB dowolna krzywizna grzbietobrzuszna.

Amerykański Naukowy Panel Doradczy EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013) dokonał przeglądu danych podsumowujących skoliozę z piętnastu badań przeobrażeń u płazów z wykorzystaniem platany szponiastej (etap obejmujący 51.–60+ stadium według Nieuwkoopa i Fabera) i przedstawił ogólne zalecenia dotyczące zmniejszenia częstości występowania tej nieprawidłowości w populacjach poddawanych badaniu. Zalecenia te są istotne dla badania LAGDA, mimo że to badanie dotyczy dłuższego przebiegu rozwoju.

Historyczna efektywność tarła

Ogólnie rzecz biorąc, pary hodowlane powinny składać się ze zdrowych dorosłych osobników o dobrych cechach; wyeliminowanie par hodowlanych, które produkują potomstwo ze skoliozą, może z czasem zminimalizować jej występowanie. Szczególnie korzystne może być zminimalizowanie wykorzystania dziko odławianych stad tarłowych. Okres narażenia w badaniu LAGDA rozpoczyna się, gdy zarodki znajdą się w 8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, i na początku badania nie można ustalić, czy u danych osobników wystąpi skolioza. W związku z tym, oprócz śledzenia częstości występowania skoliozy u zwierząt poddanych badaniu, należy udokumentować historycznie efektywność wylęgów (w tym częstość występowania skoliozy u larw, które mogły się rozwijać). Przydatne może okazać się dalsze monitorowanie odsetka każdego wylęgu niewykorzystanego w danym badaniu i zgłaszanie tych obserwacji (FIFRA SAP 2013).

Jakość wody

Ważne jest zapewnienie odpowiedniej jakości wody, zarówno w zapasach laboratoryjnych, jak i podczas badania. Oprócz kryteriów dotyczących jakości wody, które rutynowo poddaje się ocenie na potrzeby badań toksyczności dla organizmów wodnych, przydatne może okazać się monitorowanie i korygowanie wszelkich niedoborów składników odżywczych (np. niedoboru witaminy C, wapnia, fosforu) lub nadmiaru selenu i miedzi, które według doniesień powodują wystąpienie różnych stadiów skoliozy u laboratoryjnie hodowanych zwierząt z rodzin *Rana* i *Xenopus* (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; zgodnie z raportem FIFRA SAP 2013). Stosowanie odpowiedniego sposobu żywienia (zob. dodatek 4) oraz regularne czyszczenie zbiornika zasadniczo poprawi jakość wody i zdrowie badanych osobników.

▼M8

Dieta

Szczegółowe zalecenia dotyczące sposobu żywienia, które okazały się skuteczne w badaniu LAGDA, zostały szczegółowo opisane w dodatku 4. Zaleca się badanie źródeł pasz na obecność toksyn biologicznych, herbicydów i innych pestycydów, o których wiadomo, że powodują skoliozę u platany szponiastej lub u innych zwierząt wodnych (Schlenk i Jenkins 2013). Na przykład narażenie na niektóre inhibitory cholinesterazy zostało powiązane ze skoliozą u ryb (Schultz *et al.* 1985) i żab (Bacchetta *et al.* 2008).

BIBLIOGRAFIA

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara i 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 i R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley i 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 i 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 i P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D. i 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 maja 2013, Waszyngton.